

THESE

présentée à l'U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
pour obtenir le grade de
DOCTEUR EN PHARMACIE (Doctorat d'Etat)

par **Edwige PANEK**

Pharmacien

Titulaire des Certificats d'Etudes Supérieures
de Biochimie Générale, Biochimie Appliquée

Maître-Assistant à l'U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nancy

Assistant au Centre de Médecine Préventive de Vandœuvre-lès-Nancy

née le 12 juillet 1942 à Godynice (Pologne)

SUJET

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DES ISOENZYMES DE LA L-ASPARTATE AMINOTRANSFERASE
ET DU MECANISME D'ACTION DES BIGUANIDES HYPOGLYCEMIANTS**

SOUTENUE LE 3 FEVRIER 1973, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

Examineurs de la Thèse

Président : M. le Professeur PIERFITTE
Juges : M. SIEST, Maître de Conférences Agrégé
Mlle le Professeur BESSON
M. le Professeur DEBRY



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555415_0013

THESE

présentée à l'U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE (Doctorat d'Etat)

par **Edwige PANEK**

Pharmacien

Titulaire des Certificats d'Etudes Supérieures
de Biochimie Générale, Biochimie Appliquée

Maître-Assistant à l'U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nancy

Assistant au Centre de Médecine Préventive de Vandœuvre-lès-Nancy

née le 12 juillet 1942 à Godynice (Pologne)

SUJET

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES ISOENZYMES DE LA L-ASPARTATE AMINOTRANSFERASE

ET DU MECANISME D'ACTION DES BIGUANIDES HYPOGLYCEMIANTS

SOUTENUE LE 3 FÉVRIER 1973, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

Examineurs de la Thèse

Président : M. le Professeur PIERFITTE
Juges : M. SIEST, Maître de Conférences Agrégé
Mlle le Professeur BESSON
M. le Professeur DEBRY

UNIVERSITE DE NANCY I

U.E.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES
ET BIOLOGIQUES

ADMINISTRATION

DIRECTEUR

Professeur R. BENE

PERSONNEL ENSEIGNANT

PROFESSEURS

M.	MEUNIER A.	Pharmacie galénique
Mle	FRANCOIS M. Th.	Matière médicale
MM.	MARCHAL J.G.	Microbiologie
	SOLEIL J.	Pharmacie Chimique
	BERNANOSE A.	Physique
Mle	BESSON S.	Pharmacodynamie
MM.	BENE R.	Sciences biologiques
	MIRJOLET M.	Chimie analytique et toxicologie
	PIERFITTE M.	Chimie biologique

PROFESSEUR SANS CHAIRE

M.	MARTIN J.A.	Chimie minérale et minéralogie
----	-------------	--------------------------------

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mle	GIRARD Th.	Hygiène
MM.	HAYON J. Cl.	Matière médicale et botanique
	SCHWARTZBROD L.	Microbiologie
	SIEST G.	Chimie biologique
MM.	BONALY R.	Biochimie
	LEMAY R.	Législation et déontologie pharmaceutique
	LOPPINET V.	Chimie organique
	VIGNERON C.	Sciences biologiques appliquées à la pharmacie

MAITRES DE CONFERENCES DELEGUES

MM.	BAUDOT Ph.	Toxicologie
	BOYER P.	Physique
	LECTARD P.	Biologie Végétale et Cryptogamie

MAITRES-ASSISTANTS

M.	AIMOND	Pharmacie chimique
Mme	BALDO	Microbiologie
M.	HOFFMAN	Pharmacie galénique
M.	JACQUE	Pharmacodynamie
Mme	HOFFMAN	Pharmacie galénique
Mle	PANEK	Chimie biologique
Mme	SCHWARTZBROD	Microbiologie

ASSISTANTS sur emplois de MAITRES-ASSISTANTS

M ^{le} BARRET	Parasitologie
M. CHANSON	Biochimie
M. LABRUDE	pharmacotechnie chimique
M ^{me} LEJAILLE	Chimie analytique
M. MIGNOT	Physique
M. MONAL	Chimie (pharmacie)
M. MORTIER	Biologie végétale et pharmacognosie

ASSISTANT sur emploi de CHEF DE TRAVAUX

M. CONJAT	Chimie analytique quantitative
-----------	--------------------------------

DOYENS HONORAIRES

MM. RICHARD G.; Recteur de l'Académie de MONTPELLIER

BERNANOSE A. J. E. R. des Sciences Pharmaceutiques et biologiques

PROFESSEURS HONORAIRES

MM CORDEBARD H.
FRANQUET R.
STEIMETZ E.

MAITRES de CONFERENCES HONORAIRES

M. ANZIANI P.
M^{me} LASSEUR A.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur PIERFITTE
Professeur de Chimie Biologique

A NOS JUGES

Mademoiselle le Professeur BESSON
Professeur de Pharmacodynamie

Monsieur DEBRY
Professeur de Nutrition et Maladies Métaboliques

Monsieur SIEST
Maître de conférence agrégé de Chimie Biologique

A TOUS NOS MAITRES

De l'UER des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

A NOTRE FAMILLE

A NOS AMIS

Nous tenons à remercier pour leur aide et leurs conseils

- M. le Professeur GRIGNON et M. GUEDENET
(Service de Microscopie Electronique - UER des Sciences Médicales - NANCY)

- M. le Professeur GAYET et M. MINN
(Laboratoire de Physiologie Générale - UER des Sciences Biologiques - NANCY)

- M. le Professeur DEBRY et M. DROUIN
(Service de Diabétologie - Hôpital Jeanne d'Arc - TOUL)

Nous remercions également les laboratoires de Produits Pharmaceutiques ARON et ROGER BELLON qui nous ont aimablement fourni les biguanides utilisés.

Que tous ceux qui nous ont aidés à réaliser ce travail ou qui y ont participé, trouvent ici nos plus vifs remerciements.

Ce travail a été effectué au laboratoire de
Biochimie, 7 rue Albert Lebrun 54000 Nancy (Prof.G.SIEST)
et au Centre de Médecine Préventive, 2 avenue du Doyen Jacques
Parisot 54500 Vandoeuvre lès Nancy (Dir. Prof.R.SENAUULT et
Dr H.POULIZAC) .

PLAN DU TRAVAIL

LISTE DES ABREVIATIONS ET NOMENCLATURE DES ENZYMES

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : METHODES UTILISEES ET MISES AU POINT

1. Séparation et mesure des 2-oxoacides
2. Séparation et dosage des amino-acides
3. Enzymes, ions et autres métabolites
4. Techniques particulières
 - 4.1. Ultracentrifugation
 - 4.2. Mesure polarographique de l'oxygène
 - 4.3. Microscopie électronique
5. Matériel biologique et tests statistiques utilisés

DEUXIEME PARTIE : ETUDE DES ISOENZYMES DE LA L-ASPARTATE AMINOTRANSFERASE

6. Données actuelles sur les aspartate-aminotransférases
7. Méthodes de mesure de l'aspartate-aminotransférase
8. Extraction et séparation des isoenzymes
9. Variations de la GOT plasmatique, globulaire et tissulaire

TROISIEME PARTIE : APPLICATION AU MECANISME D'ACTION DES BIGUANIDES HYPOGLYCEMIANTS

10. Utilisation thérapeutique des biguanides. Hypothèses sur les mécanismes d'action
11. Etude de l'effet des biguanides chez l'homme
12. Jeûne et gluconéogénèse
13. Etude in vivo chez le rat
14. Etude in vitro chez le rat

CONCLUSIONS GENERALES

BIBLIOGRAPHIE

ABREVIATIONS UTILISEES

A.D.P	Acide adénosine diphosphorique
A.T.P	Acide adénosine triphosphorique
C.C.M	Chromatographie en couches minces
C.P.G	Chromatographie en phase gazeuse
D.B.I	Phényléthylbiguanide
D.M.B.	Diméthylbiguanide
D.N.P H.	2-4 dinitrophénylhydrazine
G.D.P.	Acide guanosine diphosphorique
G.T.P.	Acide guanosine triphosphorique
N.A.D.	Diphosphonucléotide d'adénine et de nicotinamide
N.A.D.P.	Triphosphonucléotide d'adénine et de nicotinamide
n At	10^{-9} atomes
P.E.P.	Phosphoénolpyruvate
P.GOT	GOT plasmatique
S.GOT	GOT sérique
U.I.	Unités internationales (nombre de micromoles de substrat transformé par minute et par litre)

NOMENCLATURE DES ENZYMES

Fructose 1-6 diphosphatase	(E.C.3.1.3.11)
Glucokinase	(E.C.2.7.1.2)
Glucose-6-phosphatase	(E.C.3.1.3.9)
Glycogène synthétase : UDP glucose : α 1-4 glucane glucosyltransférase	(E.C.2.4.1.1)
GOT L.aspartate : 2 oxo-glutarate aminotransférase	(E.C.2.6.1.1)
GPT L.alanine : 2 oxo-glutarate aminotransférase	(E.C.2.6.1.2)
LDH Lactate déhydrogénase : L.lactate : NAD oxydoreductase	(E.C.1.1.1.27)
MDH Malicodéhydrogénase : L.malate : NAD oxydoréductase	(E.C.1.1.1.37)
Phosphoénolpyruvate-carboxykinase	(E.C.4.1.1.32)
Phosphofructokinase	(E.C.2.7.1.11)
PK Pyruvate kinase : ATP pyruvate-phosphotransférase	(E.C.2.7.1.40)
Pyruvate-carboxylase	(E.C.6.4.1.1)

INTRODUCTION

Les biguanides abaissent chez l'animal et chez l'homme diabétique le taux de la glycémie. Trois composés sont couramment administrés aux diabétiques comme hypoglycémifiants (tableau I).

TABEAU I : BIGUANIDES HYPOGLYCEMIANTS UTILISES

$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{N} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{C} \quad \text{C} - \text{NH}_2 \\ \backslash \quad / \quad \backslash \quad / \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{N} \quad \text{C} \quad \text{C} \\ \quad \quad \quad \parallel \quad \parallel \\ \quad \quad \quad \text{NH} \quad \text{NH} \end{array} $	N-N-diméthylbiguanide
$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{N} \\ / \quad \backslash \\ \text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{C} \quad \text{C} - \text{NH}_2 \\ \backslash \quad / \quad \backslash \quad / \\ \text{NH} \quad \text{C} \quad \text{C} \\ \quad \quad \parallel \quad \parallel \\ \quad \quad \text{NH} \quad \text{NH} \end{array} $	Phényl-éthylbiguanide
$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{N} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{C} \quad \text{C} - \text{NH}_2 \\ \backslash \quad / \quad \backslash \quad / \\ \text{NH} \quad \text{C} \quad \text{C} \\ \quad \quad \parallel \quad \parallel \\ \quad \quad \text{NH} \quad \text{NH} \end{array} $	Butyl-biguanide

Leur mécanisme d'action n'est pas encore connu.

Chez l'homme, la glycémie représente la concentration d'un substrat énergétique biologique dissout dans le liquide extra-cellulaire et doit rester relativement constante car certains tissus (le cerveau en particulier) ne peuvent utiliser que l'énergie fournie par le métabolisme du glucose.

La régulation des entrées et des sorties du glucose sanguin (figure 1) est donc importante.

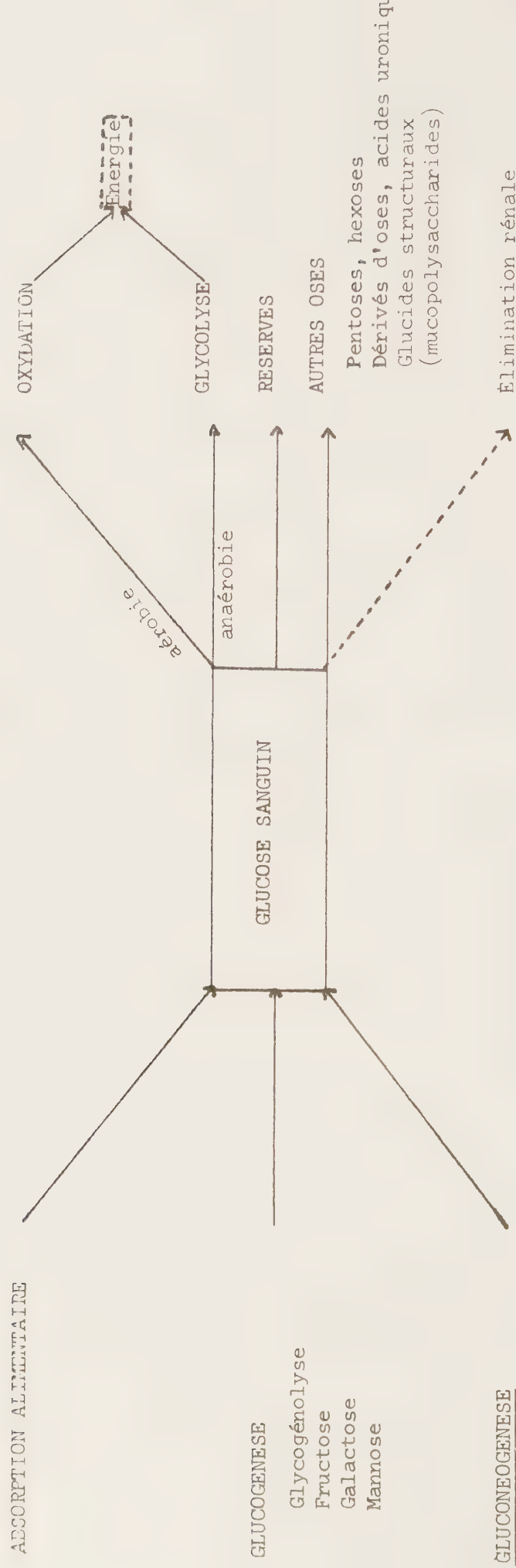


Figure 1 : Schéma des apports et de l'utilisation du glucose sanguin

De nombreux facteurs participent à cette glycorégulation :

- facteurs hormonaux

- . insuline
- . catécholamines
- . cortisol
- . hormone somatotrope
- . glucagon
- . hormones digestives : pancréozymine, sécrétine, entéro-glucagon

- facteurs métaboliques

- . électrolytes (potassium, calcium...)
- . niveau même de la glycémie
- . corps cétoniques
- . acides aminés
- . acides gras
- . activité tissulaire (tissu adipeux...)

- facteurs physiologiques

- . effort musculaire
- . jeûne
- . alimentation

Les biguanides sont donc susceptibles d'intervenir à différents niveaux pour abaisser la glycémie chez le diabétique.

Parmi beaucoup d'autres (effet sur l'insuline, ralentissement de la résorption intestinale du glucose, augmentation de l'oxydation périphérique du glucose, accélération de la lipolyse...) une hypothèse a retenu notre attention : celle présentée par MEYER, CLAUSER (312) et IPAKTCHI (218) selon laquelle les biguanides auraient un effet inhibiteur sur la production du glucose à partir d'acides aminés et de métabolites du cycle tricarboxylique, c'est-à-dire sur la gluconéogénèse.

La glucogénèse fournit du glucose à partir du lactate, du pyruvate, des lipides et des aminoacides (figure 2).

- à partir du lactate et du pyruvate

La biosynthèse du glucose à partir de l'acide pyruvique et de l'acide lactique est donc possible dans le foie et dans le rein dans des conditions d'aérobiose qui fourniront l'apport énergétique indispensable sous forme d'ATP.

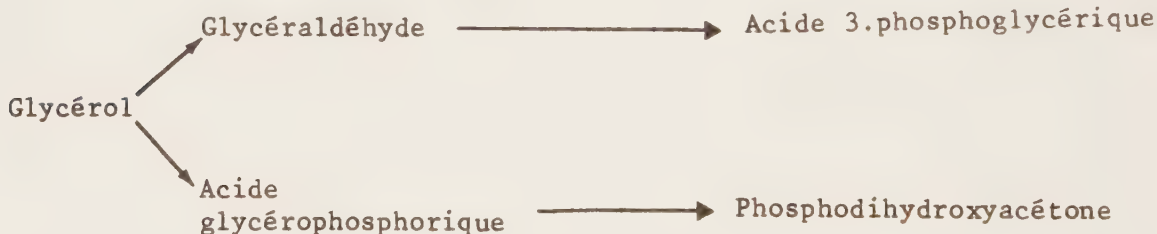
L'action de la lactico-deshydrogénase étant réversible, on peut considérer indifféremment la voie de la biosynthèse du glucose à partir de ces deux métabolites comme un seul et même mécanisme.

- à partir des lipides

L'hydrolyse des glycérides, les plus importants des constituants des lipides alimentaires, libère du glycérol et des acides gras.

a) Glucogénèse à partir du glycérol :

Le glycérol rejoint, dans le foie, le métabolisme des glucides selon deux voies :



b) Glucogénèse à partir des acides gras :

Les acides gras à nombre pair d'atomes de carbone conduisent à l'acétyl-coenzyme A qui peut, par l'intermédiaire du cycle tricarboxylique de Krebs, s'intégrer secondairement dans des structures glucidiques.

Les acides gras à nombre impair d'atomes de carbone conduisent au propionyl-coenzyme A.

Ce dernier subit une carboxylation puis une isomérisation par migration intramoléculaire de COOH. Il se transforme ainsi en succinyl-coenzyme A, intégré dans le cycle tricarboxylique de Krebs.

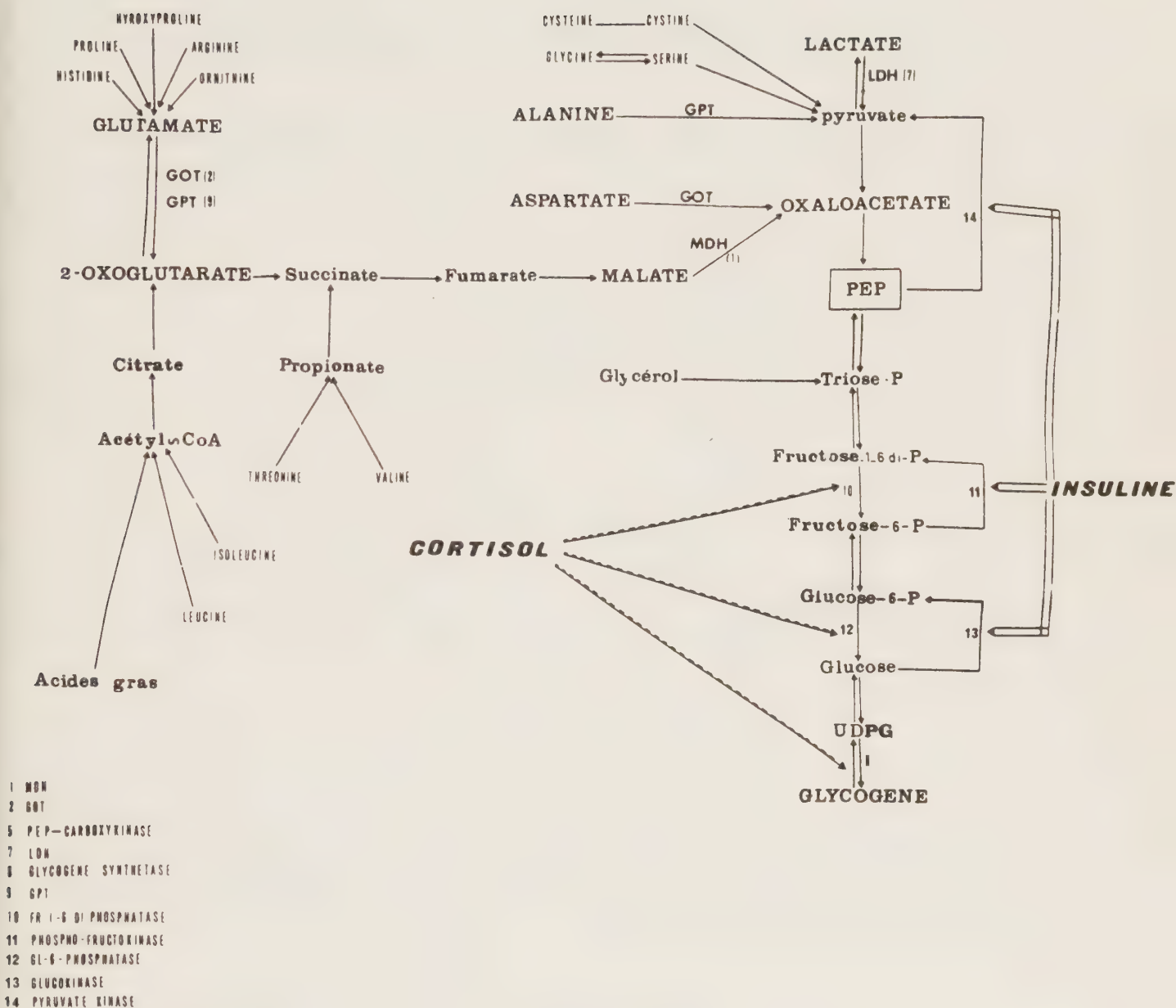


Figure 2 : La gluconéogénèse

- à partir des aminoacides

La copule carbonée des aminoacides conduit, pour certains d'entre eux, à des composés qui sont des intermédiaires du catabolisme glucidique ou des intermédiaires du cycle tricarboxylique de Krebs. Ces structures peuvent s'intégrer dans les molécules glucidiques et c'est pourquoi on donne à ces aminoacides le nom d'acides glucoformateurs. Ce sont :

- a) Aminoacides conduisant à l'acide 2-oxoglutarique :
 - . acide glutamique
 - . histidine
 - . proline
 - . hydroxyproline
 - . arginine
- b) Aminoacides conduisant à l'acide oxalo-acétique :
 - . acide aspartique
- c) Aminoacides conduisant à l'acide pyruvique :
 - . cystéine
 - . alanine
 - . sérine
 - . glycofolle (via la sérine)
 - . thréonine (via le glycofolle et la sérine)
- d) Aminoacides conduisant au succinyl-coenzyme A (par le propionyl-coenzyme A)
 - . thréonine
 - . valine
 - . isoleucine
 - . méthionine

La gluconéogénèse est importante chez l'homme ou l'animal à jeûn, chez le diabétique, et après injection de cortisol. Parmi les différentes actions de l'insuline, on sait que l'une de ces actions est de réprimer l'activité des enzymes qui sont sous contrôle de la cortisone et qui jouent un rôle déterminant dans la gluconéogénèse.

Chez le diabétique l'absence ou l'inactivation de l'insuline a pour conséquence une activité accrue des enzymes assurant la production de glucose à partir de petites molécules provenant en particulier de la dégradation des acides aminés. On trouve d'ailleurs un taux élevé d'acides aminés dans le plasma des diabétiques.

On sait depuis bientôt quarante ans que la biosynthèse du glucose à partir du pyruvate et du lactate est un processus physiologique important. Toutefois, les progrès dans la compréhension de la gluconéogénèse ont été lents en raison de la croyance erronée que toutes les réactions de la glycolyse étaient réversibles et que le glucose était synthétisé par les mêmes enzymes (83).

Ce concept, éminemment respectable du point de vue thermodynamique, ne tenait pas compte du fait que trois réactions de la glycolyse sont fortement exothermiques et constituent des barrières énergétiques importantes au fonctionnement réverse du cycle glycolytique dans des conditions physiologiques.

Il s'agit des réactions catalysées respectivement par l'hexokinase, la phosphofructokinase et la pyruvate-kinase.

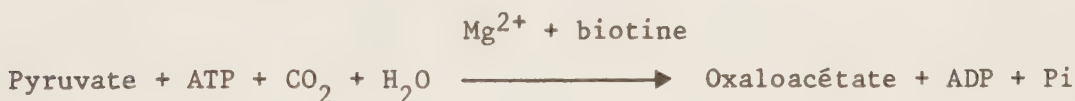
On sait maintenant que la gluconéogénèse utilise les enzymes qui sont effectivement réversibles dans la glycolyse et trois systèmes qui se substituent aux réactions fortement endergoniques, dans la direction de la resynthèse du glucose.

Il s'agit de la synthèse

- . du phosphoénolpyruvate à partir de pyruvate
(par une voie différente de celle de la pyruvate-kinase)
- . de la transformation du fructose-1,6-diphosphate en fructose-6-phosphate
- . de l'hydrolyse du glucose-6-phosphate

La synthèse du phosphoénolpyruvate, à partir des acides aminés, a retenu particulièrement notre attention.

La voie passant par deux enzymes successives, la pyruvate-carboxylase et la phosphoénolpyruvate-carboxykinase semble la plus probable.



(Pyruvate-carboxylase)



(PEP-carboxykinase)

Deux équivalents de nucléotide triphosphate sont requis par cette voie, d'où il résulte que la réaction est exothermique et ne représente plus de barrière énergétique (l'énergie libre d'hydrolyse du phosphoénolpyruvate est de 12,8 Kcal/mole et celle de deux équivalents d'ATP de 14 Kcal/mole).

Les deux enzymes, pyruvate-carboxylase et phosphoénolpyruvate-carboxykinase, existent dans le foie et dans le rein à des concentrations élevées alors que la pyruvate-carboxylase est virtuellement absente dans les organes dépourvus d'action gluconéogénétique, comme le cerveau, le coeur et les muscles striés.

Notons encore que l'oxaloacétate peut également provenir du malate. En effet, le malate peut être oxydé en oxaloacétate par la malate-deshydrogénase.

La régulation de la gluconéogénèse se fait au niveau de l'activation de la pyruvate-carboxylase et de la PEP-carboxykinase. Cette enzyme augmente en activité et en quantité dans le foie d'animaux diabétiques. Elle est fortement réprimée par l'insuline et activée par la cortisone. Il en est de même des autres enzymes contrôlant des étapes non réversibles.

Pour étudier l'effet des biguanides sur la gluconéogénèse, il était donc nécessaire, ainsi que le rappelle la figure 2, de pouvoir mesurer

1) les 2 oxo-acides

- . l'acide oxaloacétique
- . l'acide 2-oxoglutarique
- . l'acide pyruvique

2) les acides aminés, en particulier

- . alanine
- . acide aspartique
- . acide glutamique
- . glycocolle
- . leucine

3) certains systèmes enzymatiques

- . MDH
- . GOT

4) le lactate et le glucose

5) les ions

- . calcium
- . magnésium
- . sodium
- . potassium

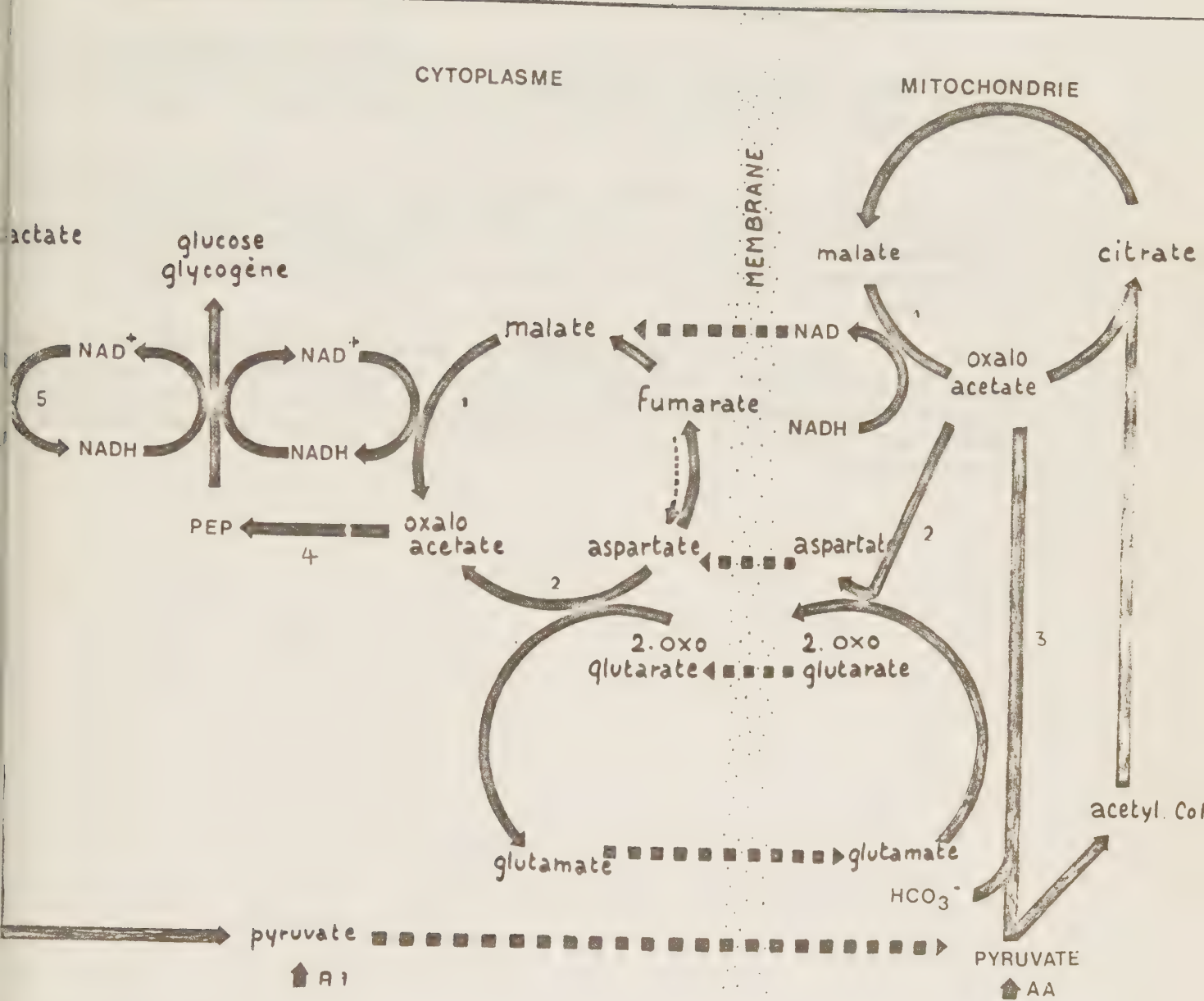


Figure 3 : Gluconéogénèse et compartimentation intracellulaire des enzymes et des substrats.

(1) MDH ; (2) GOT ; (3) pyruvate carboxylase ; (4) phosphoenolpyruvate carboxykinase ; (5) LDH

Mais il faut tenir compte des problèmes de compartimentation cellulaire ; en particulier l'oxaloacétate ne peut pas traverser la membrane mitochondriale (figure 3).

Il nous était donc nécessaire de séparer les mitochondries et les formes moléculaires des enzymes, en particulier la GOT. Certaines transaminases sont en effet induites dans les conditions de la gluconéogenèse.

En effet, nous avons voulu limiter notre contribution à l'étude de l'effet des biguanides sur cette enzyme, puis ayant bien en main la technologie de séparation et de mesure de cette activité, nous avons utilisé ces enzymes comme marqueurs du comportement mitochondrial sous l'effet des biguanides.

Nous présentons donc dans la première partie, les méthodes mises au point et utilisées, puis dans la seconde partie, l'étude des formes moléculaires de l'aspartate-aminotransférase, enfin dans la troisième partie, nos essais sur le mécanisme d'action des biguanides sur certains processus de la gluconéogenèse.

P R E M I E R E P A R T I E

METHODES UTILISEES ET MISES AU POINT

CHAPITRE I

SEPARATION ET MESURE DES 2 OXO-ACIDES

Nous avons entrepris les séparations et dosage des 2 oxo-acides (acides alphacétoniques) $R - CO - COOH$ pour suivre leurs variations dans l'organisme au cours des traitements par les biguanides hypoglycémiantes.

Pour comprendre l'origine de ces acides, il faut rappeler les processus généraux de dégradation des amino-acides.

- La décarboxylation des acides aminés conduit à toute une série de dérivés physiologiques importants (histamine, sérotonine, etc...)

- La désamination oxydative conduit aux 2 oxo-acides correspondants. Ce processus est surtout important pour l'acide glutamique avec formation d'acide glutarique.

- La transamination réalise un transfert réversible du groupement NH_2 d'un acide aminé sur un 2 oxo-acide. Les transaminations sont particulièrement importantes dans l'organisme normal pour l'alanine, l'acide aspartique et l'acide glutamique et pour les 2 oxo acides correspondants : l'acide pyruvique, l'acide oxaloacétique et l'acide 2 oxo glutarique. (tableau II).

Les réactions de transamination peuvent intervenir pour la synthèse des acides aminés ou pour leur dégradation. Dans les réactions cataboliques, la transamination est généralement une voie mineure mais que l'organisme utilisera plus largement dans la mesure où les voies majeures habituelles seront interrompues ou diminuées.

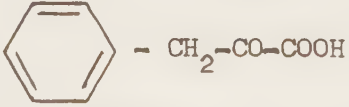
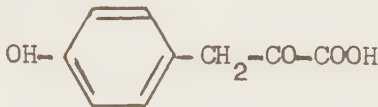
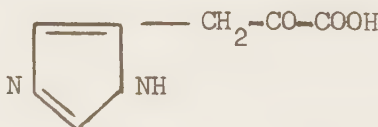
En tenant compte de l'hypothèse présentée par MEYER, IPAKTCHI et CLAUSER (218, 312) selon laquelle les biguanides auraient un effet inhibiteur sur la production du glucose à partir d'acides aminés et de métabolites du cycle di ou tricarboxylique, c'est-à-dire sur la gluconéogénèse, les biguanides pourraient bloquer différentes réactions impliquant les 2 oxo acides :

- inhibition du passage à l'oxaloacétate (cas du diméthylbiguanide) donc action au niveau de la pyruvate carboxylase

- inhibition des réactions de transamination (cas du phényl-éthylbiguanide).

Il nous était donc indispensable d'avoir des méthodes de dosage spécifique, ou de séparer par chromatographie ces différents 2-oxo acides : pyruvate, oxaloacétate, 2-oxo glutarate et deux composés que l'on extrait simultanément, l'acétoacétate et son produit de décarboxylation, l'acétone.

TABLEAU II : 2 OXO ACIDES ET ACIDES AMINES DONT ILS PEUVENT PROVENIR
PAR TRANSAMINATION (T) OU PAR DESAMINATION (D).

		Acides aminés dont ils proviennent
Pyruvique	$\text{CH}_3 - \text{CO} - \text{COOH}$	Alanine (T) Sérine (D)
Oxaloacétique	$\text{COOH} - \text{CH}_2 - \text{CO} - \text{COOH}$	Acide aspartique (T)
2-oxo-glutarique	$\text{COOH} - (\text{CH}_2)_2 - \text{CO} - \text{COOH}$	Acide glutamique (T)
2-oxo-butyrique	$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CO} - \text{COOH}$	Homosérine et Thrénine (D)
2-oxo-isoca- proïque	$\text{CH}_3 - \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \text{CH}_2 - \text{CO} - \text{COOH}$	Leucine (T)
2-oxo-isovalé- rique	$\text{CH}_3 - \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}_2} - \text{CO} - \text{COOH}$	Valine (T)
2-oxo-3-méthylva- lérique	$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \text{CO} - \text{COOH}$	Isoleucine (T)
Phénylpyruvique	 $\text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_2 - \text{CO} - \text{COOH}$	Phénylalanine (T)
p. hydroxyphényl- pyruvique	 $\text{HO} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{CH}_2 - \text{CO} - \text{COOH}$	Tyrosine (T)
Imidazolpyruvique	 $\text{Imidazole} - \text{CH}_2 - \text{CO} - \text{COOH}$	Histidine (T)

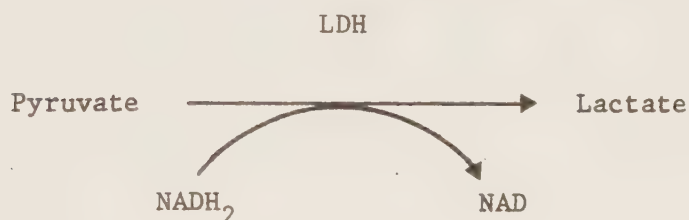
1.1. PROPRIETES GENERALES DES 2-OXO ACIDES

1.1.1. Stabilité

Ces composés sont souvent instables. Ils peuvent se décarboxyler. Dans les prélèvements d'origine biologique, il est nécessaire d'inhiber les systèmes enzymatiques afin d'éviter toute transformation des 2-oxo acides présents. Les dosages doivent donc se faire très rapidement sur des prélèvements immédiatement traités ou congelés.

1.1.2. Réduction

Ces composés sont facilement réduits en donnant l'acide-alcool correspondant. La réduction enzymatique est très utilisée pour le dosage de certains de ces composés.



1.1.3. Propriétés dues à la fonction cétone

- formation de combinaisons bisulfittiques
- formation d'oximes
- formation de semi-carbazones
- formation de 2-4 dinitrophénylhydrazones

1.1.4. Propriétés dues à la fonction carboxylique

- acidité, formation de sels
- formation d'esters (méthyliques)

1.1.5. Propriétés dues à la fonction cétone et à la fonction acide

- formation de quinoxalines fluorescentes (47, 334, 447, 469, 476).

1.2. SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE

Cinq possibilités de séparation chromatographiques s'offraient à nous :

- chromatographie des acides libres sur colonne de silicagel ou résine échangeuse d'anions (Dowex 1)
- séparation après formation d'esters méthyliques (chromatographie sur couche mince ou en phase gazeuse), de quinolaxines, d'oximes ou de 2-4 dinitrophénylhydrazones (la plus couramment utilisée).

1.2.1. Les quinoxalines

Ces dérivés plus longs à former que les hydrazones (47,334) seraient plus spécifiques.

Ces composés sont fluorescents. Cette propriété est utilisée pour leur révélation ou leur dosage (70, 329, 334, 447, 469, 476).

Peu volatiles, les quinoxalines sont séparées par chromatographie en phase gazeuse sous forme de dérivés triméthylsilylés (208).

1.2.2. Les oximes

Ces dérivés sont peu utilisés (47). HORRI et coll. (215) bloquent la fonction cétonique des acides α cétoniques à l'état d'oximes avant de former des esters triméthylsilylés pour la chromatographie en phase gazeuse (CPG).

1.2.3. Les esters méthyliques des oxo-acides

Les esters méthyliques des 2 oxo-acides sont préparés uniquement pour la chromatographie en phase gazeuse afin de diminuer la réactivité du groupement carboxylique libre.

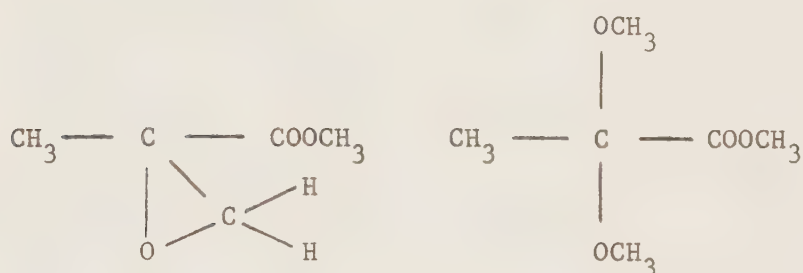
1.2.3.1. Formation

Deux voies différentes sont suivies pour leur préparation :

- méthylation directe
- méthylation des hydrazones puis coupure par l'ozone du reste hydrazinique

1.2.3.2. Méthylation directe

La méthylation par le diazométhane est le procédé le plus utilisé. On peut partir du "diazald" du commerce (436) ou le préparer soi-même. Nous avons utilisé la méthode décrite par WOLFF (505). D'autres procédés de méthylation, en particulier par HCl gazeux dans du méthanol (436) sont valables. Cependant, le travail de SIMMONDS et coll. (436) fait ressortir les difficultés de méthylation des 2-oxo acides, car il se forme, quel que soit le procédé utilisé, d'autres composés. Ces auteurs mettent en évidence (par analyse élémentaire et par résonnance magnétique nucléaire, spectrophotométrie infra-rouge) que le pyruvate donne un ester méthylique mais aussi par méthylation par le diazométhane, le méthyl-2-méthylglycidate et par méthylation par HCl gazeux le méthyl-2-2-diméthoxypyruvate.



Méthyl-2-méthylglycidate

Méthyl-2-2-diméthoxypyruvate

L'interprétation des résultats obtenus par CPG (189, 395) des esters méthyliques reste donc sujette à discussion.

1.2.3.3. Méthylation des hydrazones et coupure par l'ozone

Ce procédé est largement décrit par RONKAINEN (382, 383, 385, 387, 388). Cet auteur procède d'abord à la méthylation des hydrazones par le diazométhane méthanol (1/4). Puis il faut barboter de l'oxygène contenant deux volumes pour cent d'ozone.

Le groupement carbonyle étant protégé pendant la méthylation, cette méthode devrait être supérieure à la précédente. Mais il se forme des artefacts, l'ozone attaque des diesters et l'acide oxaloacétique se décarboxyle.

1.2.3.4. Chromatographie

Seule la chromatographie en phase gazeuse est utilisée pour ces composés. Voici les conditions opératoires décrites :

- . Support chromosorb W traité par le diméthylchlorosilane (382,395)
- . Phase liquide :
 - Castorwax (189)
 - DEGA contenant H_3PO_4 (382, 383, 388)
 - Neopentylglycolsuccinate + H_3PO_4 (387)
 - DEGS (395)
- . Colonnes en acier ou verre
- . Détecteur à ionisation de flamme
- . Gaz vecteur :
 - N_2 (25 ml/mm) (189)
 - Helium (65 ml/mm) (388)
 - Hydrogène (189)
- . Température : 80 à 200°

Parmi les différents résultats obtenus, nous avons relevé la nette séparation des esters méthyliques des acides 2-oxo β méthylvalérique et 2-oxo-isocaproïque (383, 388).

1.2.4. Les 2-4 dinitrophenylhydrazones des 2-oxo acides

La séparation des 2-oxo acides à l'état d'hydrazones, présente des avantages certains : formation de dérivés colorés faciles à suivre, à localiser sur les chromatographies et à doser, extraction plus aisée des milieux biologiques, stabilité supérieure à celle des 2-oxo acides libres, purification possible, identification supplémentaire après hydrogénation catalytique et formation d'acides aminés.

Mais, il y a également des inconvénients tels que la formation fréquente de deux isomères, des manipulations longues, donc une récupération partielle.

La 2-4 dinitrophénylhydrazine réagit également avec d'autres dérivés carbonylés (aldéhydes-cétones) donnant des hydrazines neutres et même semble-t-il, avec certains acides organiques (lactique, malique, trichloracétique, etc...) pour donner des dérivés du benzotriazole (334).

1.2.4.1. Formation

Préparation des prises d'essai de matériel biologique.

Le sang est prélevé sans garrot, à jeûn, sur iodacétate (334) sur héparine (97) ou sur un mélange citrate-fluorure-cétavlon (44,136). On effectue le plus rapidement possible la déprotéinisation. La défécation tungs-tique est la plus fréquente (44, 70, 108, 136, 232, 235, 334). L'urine doit être traitée rapidement, sinon il faut la congeler. Le prélèvement peut se faire sur thymol, sur H_2SO_4 5 % ou comme le sang, sur citrate-fluorure-cétavlon (370).

BISERTE et coll. adsorbent les pigments biliaires sur charbon activé (370). Les protéines sont éliminées par l'acide perchlorique.

Les réactifs à la 2-4 dinitrophénylhydrazine (DNPH)

La DNPH est en général dissoute dans HCl N ou 2 N. La solubilité de ce composé est faible : on peut aisément préparer une solution à 0,1 %. Mais un léger chauffage ou une augmentation de l'acidité est nécessaire afin d'obtenir une concentration supérieure.

C'est pourquoi d'autres réactifs ont été proposés :

- . réactif phosphorique (197)
- . réactif phosphorique-éthanol (93)

Ces solutions sont stables au moins huit jours à 0° et à l'obscurité.

Conditions opératoires optima

A une prise d'essai déprotéinisée, il faut ajouter un excès de réactifs précédent. Cet excès ne doit pas être trop grand sinon il sera difficile de l'éliminer ultérieurement.

Les hydrazones se forment habituellement à température ordinaire : trente minutes à 25° sont nécessaires et suffisantes (108). Une température supérieure accélère la formation des hydrazones (197) mais également celle d'artefacts (334). Certains préfèrent effectuer la précipitation à +4° pendant douze heures (90).

La précipitation n'a lieu qu'à partir d'une certaine concentration de dérivé carbonylé.

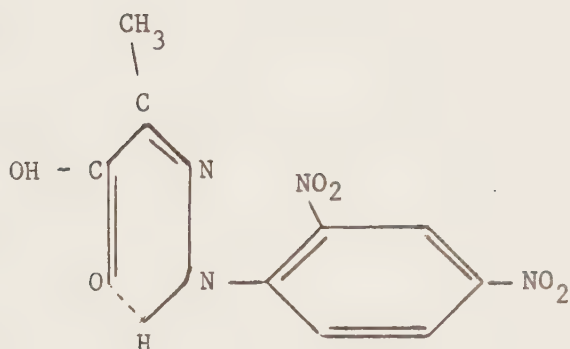
Lorsque plusieurs dérivés sont présents simultanément, celui qui se trouve en faible quantité ne précipitera pas (384). Mais ils seront tous extraits par les solvants.

Lorsque la précipitation est terminée, CAVALLINI et MONDOVI (70) ajoutent du formol (formation d'hydrazones neutres) pour éliminer l'excès de DNPH.

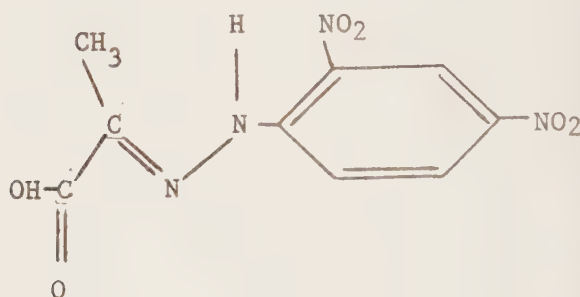
1.2.4.2. Propriétés

Formation d'isomères

On retrouve souvent pour une hydrazone donnée, plusieurs taches après chromatographie, ceci étant dû à la formation d'isomères cis-trans. NEISH (334) a relevé les formules ci-dessous pour les isomères de l'acide pyruvique.



Isomère I



Isomère II

Il faut remarquer que RONKAINEN (389) obtient également deux spots avec des esters méthyliques d'hydrazones ce qui est compatible avec la formule I.

Le nombre d'extractions par des solvants, le vieillissement, la température sont autant de facteurs responsables de la formation accélérée d'isomères (370).

RASMUSSEN (370) n'obtient pas d'isomères - même après chromatographie - en conservant les hydrazones dans NH_4OH 1 N à -15° .

Suivant les conditions opératoires, tous les 2-oxo acides ne semblent pas donner simultanément les isomères (334,438) à moins que seules les vitesses de formation ne diffèrent.

Ces isomères pourront être différenciés après chromatographie (93) par KOH alcoolique. La réactivité des isomères est en effet différente (370) ainsi que certaines de leurs propriétés telles que l'hydrogénation. Cette dernière réaction serait même impossible pour l'une des formes stériques (334).

Régénération des 2-oxo acides

Les 2-oxo acides peuvent être régénérés à partir de leur hydrazone par un excès de composés carbonylés : 2-3 butanedione, acide formique, acide 2-oxo glutarique, acide lévulinique (238).

Il est possible également de provoquer la rupture de la 2-4 dinitrophénylhydrazone par chauffage dans le méthanol-sulfurique ou par ozonisation (383,387). L'ozone trouvera surtout une application lors de la conversion des esters méthyliques des hydrazones en 2-oxo acides simplement méthylés.

Extraction - purification

Les hydrazones formées (et l'excès de DNPH) sont d'abord extraites par des solvants organiques : éther (44, 70, 90, 108, 136, 232, 234, 235, 238, 384, 438), acétate d'éthyle (238, 438), chloroforme-éthanol (47) ou xylène (98).

HEISTAND (197) utilise un solvant non polaire (hexane, tétrachlorure, etc...) et mesure directement au spectrophotomètre l'intensité de la coloration obtenue. La purification des hydrazones extraites a pour but d'éliminer l'excès de DNPH et les hydrazones neutres. En général, la solution organique précédente est agitée avec une solution alcaline : ammoniacale (38, 70, 108) carbonate (90, 98), carbonate monosodique (232, 438). Les hydrazones neutres et l'excès de DNPH doivent rester dans le solvant organique, alors que les sels alcalins des hydrazones acides passent dans la solution aqueuse alcaline. Le passage n'est pas toujours quantitatif (334, 384). C'est pourquoi certains auteurs préfèrent évaporer le premier solvant et reprendre le résidu sec par la solution alcaline : cette solution alcaline peut subir ensuite deux traitements :

- . Agitation avec un solvant organique pour éliminer les hydrazones neutres qui auraient pu passer. On utilise ensuite la phase aqueuse pour la chromatographie (70, 108, 136, 232, 370).
- . Neutralisation par un acide, puis agitation avec de l'éther (90) de l'acétate d'éthyle (438) ou du chlorure de méthylène (98).

La solution organique est évaporée ou utilisée directement pour la chromatographie.

Signalons encore le procédé de RONKAINEN (384) qui, après fixation sur du charbon activé, sépare les hydrazones des aldéhydes de celles des 2-oxo acides par élution sélective. Mais ce procédé est très long (48 heures au Soxhlet !). De même, DREW et coll. (in NEISH) purifient les hydrazones par chromatographie préalable sur colonne. CHRISTOFARO et EGLI (93) préconisent également l'élimination de l'excès d'hydrazine par passage sur une colonne d'alumine acide.

La stabilité, la formation d'isomères et la séparation chromatographique elle-même, dépendent du solvant utilisé pour le dépôt : les hydrazones des acides 2-oxo isocaproïque et 2-oxo 3 méthylvalérique ne sont séparées par chromatographie en couche mince qu'après dépôt en solution pyridinique (386).

1.2.4.3. Chromatographie des hydrazones

- Chromatographie sur papier

La chromatographie sur papier reste la méthode de séparation la plus utilisée à l'heure actuelle.

On prend souvent des papiers épais afin de pouvoir déposer de grandes quantités de solutions. Certains auteurs (14, 232) préfèrent effectuer une découpe du papier selon MATHIAS (305). Enfin récemment, SMITH (438) a étudié la séparation accélérée sur des papiers spéciaux (papiers siliconés, avec gel de silice, etc...)

L'imprégnation du papier par des tampons phosphate (232) borate, glycine, bicarbonate (47), véronal (108,232) permettrait une meilleure résolution.

Les systèmes de solvants proposés sont extrêmement nombreux. On retrouve fréquemment les mélanges butanol-éthanol-eau (38, 47, 108, 232, 334, 370, 441). Le butanol peut être remplacé par l'alcool isoamylique (47, 232, 334, 370). La phase aqueuse est parfois alcalinisée (47, 226, 334, 433) ce qui semble accélérer la migration (334) mais aussi la formation d'isomères (438).

Dans le travail de SMITH, nous avons remarqué qu'avec un mélange benzène-acide acétique ou formique 19/1 v/v il n'y avait pratiquement pas d'isomérisation, contrairement à ce que l'on peut observer avec une solution de carbonate monosodique comme solvant.

Les taches étant jaunes, on peut facilement suivre leur migration. En lumière ultra-violette, elles présentent une fluorescence rouge encore plus visible.

La limite de détection serait de 0,05 micromoles, de 2-oxo acide (47). Certains auteurs, après séchage du chromatogramme, pulvérisent des solutions alcooliques de soude (226) ou de potasse (47) pour intensifier les taches (et les différencier du DNPH restant).

Enfin, si on veut estimer le taux de chaque hydrazone, on découpe les taches et on extrait les hydrazones par NaOH 2 N ou mieux, par une solution de carbonate disodique à 10 % (232) dans laquelle les hydrazones sont plus stables.

- Chromatographie en couche mince

Dans le tableau 3 sont regroupées six méthodes de chromatographie en couche mince.

COTTE et coll. (90) ont repris la méthode de RONKAINEN. Mais ces auteurs préparent le gel de silice avec de l'acide propionique quoique RONKAINEN ait donné sa préférence à un support neutre.

RONKAINEN arrive à séparer l'acide 2 oxo isocaproïque de l'acide 2-oxo-3-méthylvalérique lorsque ces deux acides sont en quantité égale et lorsque les hydrazones sont déposées dans une solution de pyridine. COTTE et coll. (90) présentent un schéma (et non une photographie) où ces deux acides sont également séparés mais dans un ordre de migration inverse de celui de RONKAINEN (quoique utilisant le même solvant). En rassemblant les résultats de RONKAINEN et de COTTE et coll. on peut classer les 2-oxo acides dans l'ordre suivant : acide 2-oxo-3-méthylvalérique et acide 2-oxo isocaproïque > acide 2-oxo-isovalérique > acide 2-oxo butyrique > acide pyruvique - acide phénylpyruvique - acide p-hydroxy-phénylpyruvique > acide 2-oxo-glutarique > acide oxaloacétique (l'acide pyruvique n'a été noté que par RONKAINEN et les acides phénylpyruvique - p-hydroxy-phénylpyruvique, que par COTTE et coll.). Ces deux auteurs ne signalent pas d'isomères. Par contre, DANCIS(97) pour de nombreux 2-oxo acides, retrouve deux spots.

Les diacides migrent le plus lentement. RASMUSSEN (370) conseille d'abaisser la proportion d'ammoniacque à six volumes pour mieux séparer l'acide 2-oxo glutarique et l'acide oxaloacétique.

- Chromatographie sur colonne

Nous n'avons pas trouvé de travail récent préconisant ce mode de séparation. NEISH, dans sa revue (334) avait relevé différentes méthodes :

TABLEAU III : CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE DES HYDRAZONES DES 2 OXO-ACIDES

	Supports	Solvants	
CRISTOFARO et EGLI (93)	Cellulose Macherey - Nagel 300 G (contenant CaSO ₄ 1/2 H ₂ O) préparée à l'aide d'un tampon véronal - véronal sodique pH 8,3	Butanol Ethanol Eau	100 25 125
RASMUSSEN (370)	Kieselgel G Merck (0,2 mm)	Butanol Méthanol Ammoniaque 25 %	40 100 8
DANCIS (97, 98)	Silicagel G Merck activé une nuit à 11°	Alcool isoamylique Ammoniaque 0,25 N	20 1
RONKAINEN (386)	Silicagel G Merck activé à 120° 30 minutes	Ether de pétrole Formiate d'éthyle Acide propionique	130 70 15
BERLET (36)	Silicagel Cellulose	Butanol Ethanol Ammoniaque	70 10 20
BERLET (36)	Cellulose	Benzène Tétrahydrofurane Acide acétique glacial	60 36 4

- . sur gel de silice avec élution par de l'eau saturée d'éther puis addition d'éthanol en quantité croissante
- . sur cellulose avec élution par un mélange ammoniacal-alcool amylique.
- . sur alumine avec élution par un mélange acétate d'éthyle-ethanol, puis une solution de carbonate.
- . sur bentonite et célite.

- Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Les hydrazones des 2-oxo acides n'ont pas été jusqu'à présent chromatographiées directement en phase gazeuse. Après méthylation, le reste hydrazinique doit être coupé (208). Cependant la chromatographie directe des hydrazones nous semble possible.

1.2.5. Essais personnels, méthode proposée

1.2.5.1. Réactifs et matériel

- I - HCL 6 N
- II - HCl N
- III - Solution de 2-4 dinitrophénylhydrazine à 0,2 % dans HCL 2 N (DNPH) (à renouveler chaque semaine)
- IV - Tungstate de sodium à 10 %
- V - H_2SO_4 N/6
- VI - $HClO_4$ 60 %
- VII - Acétate d'éthyle
- VIII - Ether sulfurique
- IX - Solution de $NaHCO_3$ 0,2 M
- X - $CHCl_3$
- XI - Formaldéhyde à 30 %
- XII - Na_2CO_3 à 10 g % (p/v)
- XIII - Solutions stocks de chaque 2-oxo acide 0,01 M
- XIV - Tampon véronal pH = 8,6
 - . Véronal sodique 29,4 g
 - . Acétate de sodium 2 H_2O 19,4 g
 - . HCl 180,0 ml
 - . Eau distillée.....qsp.3000,0 ml

XV - Cuve Shandon

XVI - Ensemble de chromatographie sur couche mince Desaga

XVII - Densitomètre TLD 100. Vitatron

1.2.5.2. Extraction des milieux biologiques et formation d'hydrazones

- Déprotéinisation

a) Le sang veineux, prélevé sur héparine, est immédiatement déprotéinisé

- . 1 volume de sang
- . 4 volumes de H_2SO_4 N/6 (R.5)
- . 1 volume de tungstate (R.4).

Verser goutte à goutte et en agitant

Laisser reposer 10 minutes.

Le liquide doit être brumâtre

Centrifuger

b) L'urine fraîche (ou congelée) est traitée directement.

Déprotéiniser en cas d'albuminurie importante (19 parties d'urine - 1 partie de $HClO_4$ à 60 %).

- Précipitation des 2-oxo acides

Un volume déterminé des liquides précédents (20 ml par ex.) est mis dans un tube à bouchon rôdé : on ajoute 1 ml de la solution de DNPH (R.3). Laisser en contact 30 mn à l'obscurité à température ambiante. On traite l'excès d'hydrazine par addition de 0,2 ml de formaldéhyde à 30 % (contact 5 mn).

- Extraction

Les hydrazones sont extraites par l'éther sulfurique (5 ml). Agiter. Recueillir la phase supérieure colorée en jaune. Cette extraction est poursuivie jusqu'à ce que l'éther ne se colore plus.

Toutes les fractions sont réunies, séchées sur sulfate de sodium anhydre et évaporées au bain-marie à 35° avec un évaporateur rotatif.

- Purification

Les hydrazones sont dissoutes dans 5 ml de $NaHCO_3$ 0,2 M. On agite soigneusement avec un agitateur en verre. L'excès de dinitrophényl-hydrazine et les hydrazones neutres seront éliminés par extraction par 1 ml de $CHCl_3$. Agiter et centrifuger.

Les hydrazones des 2-oxo acides restent dans la couche supérieure bicarbonatée.

Neutraliser, acidifier par HCl N (1 ml) puis réextraire les hydrazones par 1 ml d'acétate d'éthyle.

- Préparation des solutions étalons

Solutions étalons :

. 1 ml de solution stock de 2-oxo acide 0,01 M (R.13)

. 1 ml de DNPH à 0,2 % (R.3)

Laisser en contact 30 minutes.

L'excès d'hydrazine est éliminé par addition de 0,2 ml de formaldéhyde à 30 %. Contact 5 minutes.

1.2.5.3. Chromatographie sur papier

	Papiers	Solvants	Durée de la migration
SMITH (438)	Schleicher et Schüll n° 288	Benzène 19 v Acide acétique 1 v	2 heures
CAVALLINI (70)	Whatman n° 3 imprégné de tampon véronal pH = 8,6	Butanol 60 v Ethanol 15 v Eau 75 v	15 heures
BISERTE (44)	Whatman n° 3 imprégné de tampon véronal pH = 8,6	Alcool iso-amylique 75 v Ethanol 15 v Eau 60 v	15 heures

- Technique

Le papier Whatman n° 3 est imprégné dans le tampon véronal pH 8,6 puis séché une nuit sous courant d'air chaud. Le papier Schleicher et Schüll à l'oxyde d'aluminium est prêt à l'emploi.

Le volume d'échantillon déposé est de 10 µl à 20 µl. La cuve est saturée avec l'eau saturée du solvant organique (techniques de CAVALLINI et MONDOVI) ou avec 100 ml de benzène-acide acétique (technique de SMITH).

Les papiers sont mis à équilibrer dans les vapeurs de solvants puis plongés dans le solvant saturé d'eau. Lorsque le front du solvant a parcouru 20 à 25 cm, les feuilles sont séchées 30 minutes sous un courant d'air chaud. Les spots sont visibles à l'oeil nu ou mieux sous lumière ultra-violette.

- Résultats et discussion

La méthode utilisant le papier Schleicher et Schüll n° 288 et le solvant A, présentait l'avantage d'un gain de temps considérable (2 heures et non 15 heures) et un pouvoir de séparation très satisfaisant. Par suite de l'arrêt de la fabrication de ce type de papier, nous avons porté notre choix sur la technique utilisant le solvant C de CAVALLINI (butanol-éthanol-eau 60-15-75 v/v) sur papier Whatman n°3 imprégné de tampon véronal pH 8,6. Elle nous a permis de séparer les acides pyruvique, 2-oxo-butyrique, 2-oxo-isocaproïque, 2-oxo glutarique (tableau IV).

Mais nous avons été gênés par l'instabilité des 2-oxo acides et la formation d'isomères au cours de l'extraction des hydrazones puis de leur chromatographie. L'acide oxaloacétique en particulier, se décarboxyle rapidement avec formation d'acide pyruvique. Par chromatographie sur papier, nous observons deux spots : l'un correspondant à l'acide oxaloacétique, le second, moins intense, à l'acide pyruvique.

La longueur et la complexité des manipulations, le manque de sensibilité, la limitation de types d'absorbants disponibles dans les différentes classes de papier, nous ont orienté vers des essais de séparation des 2-oxo acides par chromatographie en couche mince.

1.2.5.4. Chromatographie en couche mince (C.C.M.)

- Supports

Nous avons comparé les résultats obtenus avec deux adsorbants :

- . la cellulose
- . le silicagel

La cellulose

Nos premiers essais furent effectués sur des plaques de cellulose Schleicher et Schüll n° 1440 pulvérisées avec du tampon véronal pH 8,6, d'après la technique proposée par CRISTOFARO et EGLI (93).

Le système de solvants de ces mêmes auteurs est le mélange classique butanol-éthanol-eau dans des proportions modifiées : (100-25-125 v/v). Le système alcool iso-amylque-éthanol-eau (60-15-75 v/v) (44) nous a donné des résultats voisins (figure 4).

Le silicagel

Nous avons utilisé deux types de plaques :

. Silicagel avec comme liant, l'amidon (Schleicher et Schüll n° 1500 S)

. Silicagel G Merck imprégné d'acide propionique - Technique de COTTE (90)

Kieselgel G Merck n° 7731	30 g
Acide propionique.....	20 ml
Eau distillée	40 ml

Les plaques sont séchées 10 minutes à l'air ambiant puis 30 minutes à 100°C.

Dans les deux cas, la chromatographie est développée avec le solvant de RONKAINEN (386) modifié par COTTE (90).

Acide propionique	30 ml
Formiate d'éthyle	70 ml
Ether de pétrole.....	140 ml

- Technique

Nous déposons de 2 à 4 µl de solution d'hydrazone à l'aide de pipettes Pleuger. Le solvant de migration est versé dans une cuve saturée en vapeurs de ce même solvant. Introduire alors rapidement la plaque.

Les temps de migration varient avec l'adsorbant :

- . 4 heures pour les plaques de cellulose imprégnées de tampon véronal pH 8,6
- . 40 à 90 minutes pour les plaques de silicagel

La plaque sèche très rapidement à l'air libre. Les hydrazones, colorées en jaune, se repèrent facilement. Sous lumière ultraviolette, les spots se détachent, sombres, sur fond fluorescent. (figure 5).

Les valeurs des différents R_f sont groupées dans les tableaux IV et V.

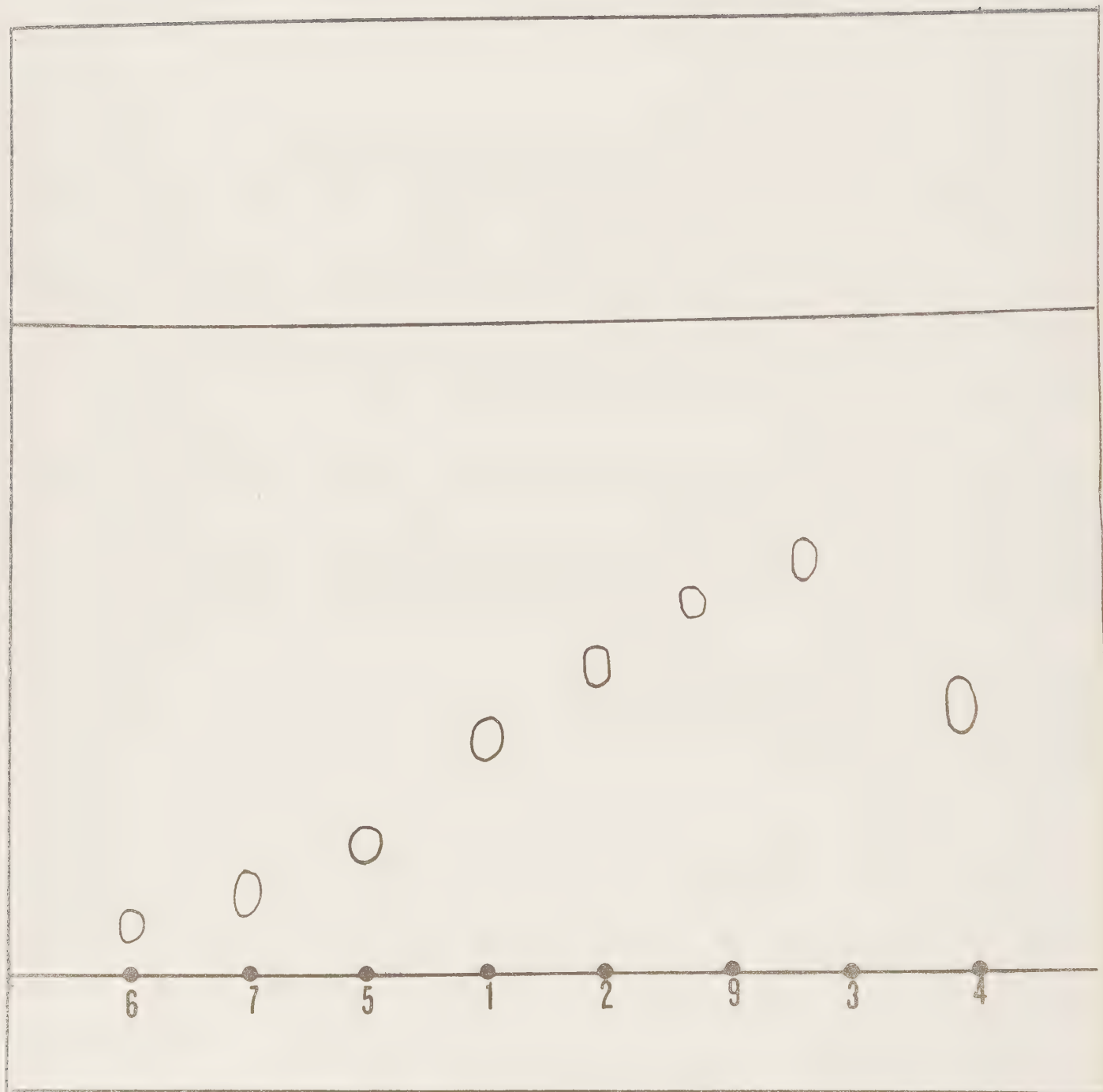


Figure 4 : Plaque de silicagel : 1500 S

Solvant : Ronkainen (Acide propionique, Formiate d'éthyle, Ether de pétrole - 30, 70, 140 v/v -)

Temps de migration : 90 mn

6 : acide oxaloacétique

7 : acide 2 oxo glutarique

5 : acide parahydroxyphénylpyruvique

2 : acide 2 oxo butyrique

9 : acide 2 oxo isovalérique

3 : acide 2 oxo isocaproïque

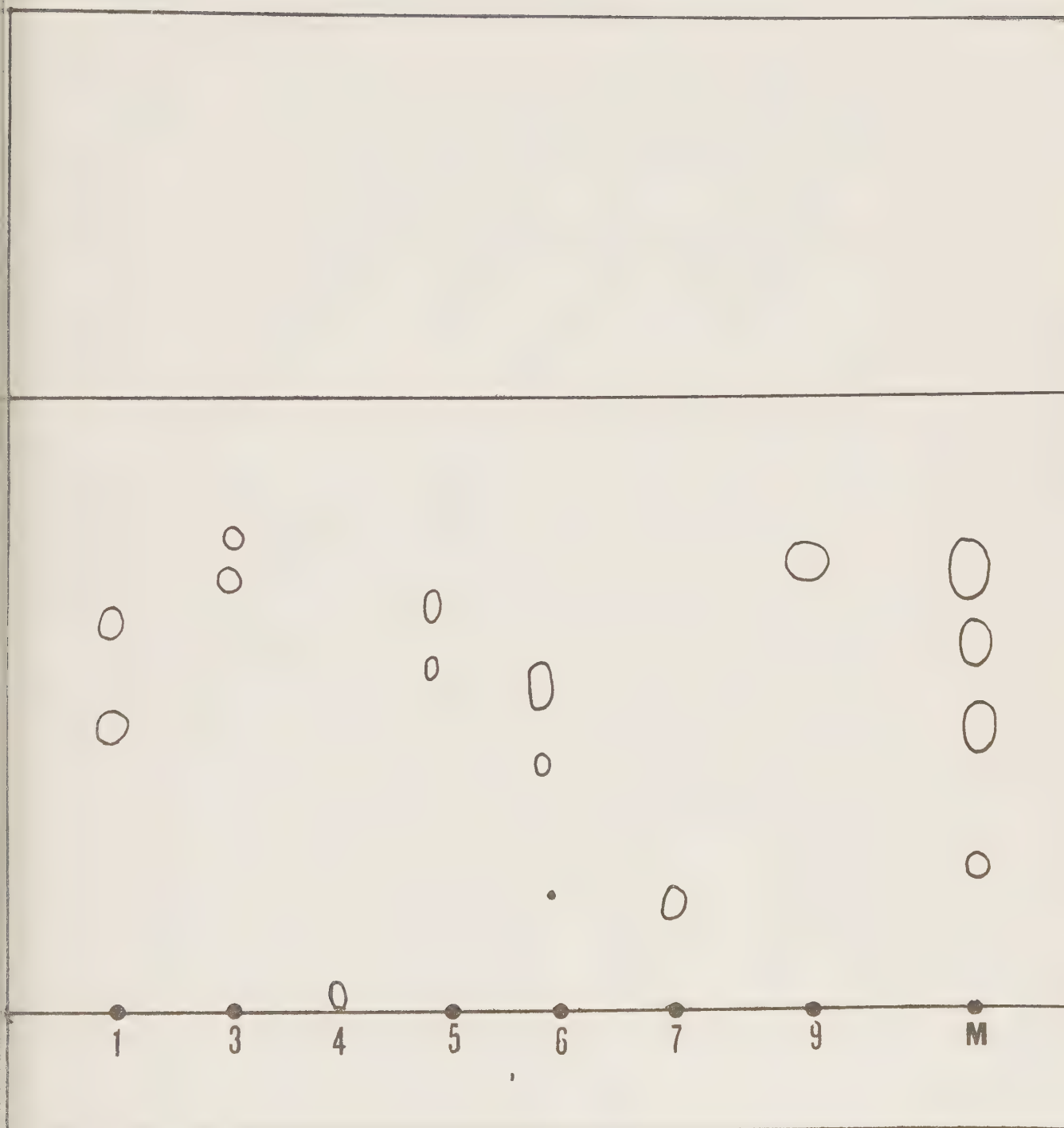


Figure 5. Plaque de cellulose imprégnée de tampon véronal pH 8,6

Solvant : butanol-éthanol-eau (40,10,50 v/v)

Temps de migration : 4 heures

1 : Acide pyruvique

3 : acide 2 oxo isocaproïque

4 : acide phénylpyruvique

5 : acide parahydroxyphénylpyruvique

6 : acide oxaloacétique

7 : acide 2 oxo glutarique

9 : acide 2 oxo isovalérique

M : mélange de quelques hydrazones

TABLEAU IV : VALEURS DES R_f ($\times 100$) DES HYDRAZONES DES 2-CXO ACIDES

Solvants

A/ Benzène - acide acétique - 19, 1 v/v

B/ Butanol - éthanol - eau - 60, 15, 75 v/v

C/ Alcool isoamylique - éthanol - eau - 75, 15, 60 v/v

(x Formation d'isomères)

	Solvant A Papier : Schleicher et Schüll n° 288	Solvant B Papier Whatman n° 3 imprégné de tampon véronal - pH = 8,6	Solvant C Papier Whatman n° 3 imprégné de tampon véronal - pH = 8,6
Acide pyruvique	8	11 x 28 x	12 x 26 x
Acide 2.oxobutyrique	17	20 x 38 x	24 x 4 x
Acide 2.oxoisocaproïque	20	55 x 71 x	32 x 56 x
Acide phénylpyruvique	13	55 x 83 x	94
Acide p. hydroxyphényl- pyruvique		20 x 65 x	16 x 3 x
Acide 2.oxoglutarique	10	0	0
Aide 2.oxoisovalérique	28	63	48
Acide oxaloacétique	0	11 x 28 x	12 x 26 x

TABLEAU V : VALEURS DES R_f (x 100) DES HYDRAZONES DES 2-OXO ACIDESSolvants

A/ Butanol - éthanol - eau (40 - 10 - 50 v/v)

B/ Alcool isoamylique - éthanol - eau (60 - 15 - 75 v/v)

C/ Ether de pétrole - formiate d'éthyle - acide propionique (140 - 70 - 30 v/v)

x Formation d'isomères

2 oxo acides	Plaque de cellulose imprégnée de tampon véronal pH 8,6		Plaque de silicagel 1500S	Plaque de silicagel G selon COTTE
	Solvant A	Solvant B	Solvant C	Solvant C
1 Acide pyruvique	45 x 63 x	13 x 30 x	35	18
2 Acide 2 oxobutyrique			45	
3 Acide 2 oxoisocaproïque	72 79 x	43 x 60 x	62	37
4 Acide phénylpyruvique	0		34	
5 Acide p. hydroxyphényl- pyruvique	54 x 66 x	39	20	
6 Acide oxaloacétique	18 x 45 x		6	18
7 Acide 2 oxoglutarique	18	0	11	0
9 Acide 2 oxoisovalérique	72	52	54	30

- Résultats et discussion

Nous préférons la chromatographie sur couche mince pour sa rapidité, sa simplicité, sa précision supérieure (les spots sont beaucoup mieux délimités que sur papier).

Sur plaque de cellulose, la séparation des 2-oxo acides est satisfaisante, mais la préparation de l'adsorbant est longue, les isomères plus nombreux ; les acides 2 oxo-glutarique et phénylpyruvique ne migrent pas en présence respectivement du solvant B et du solvant A.

Le solvant de RONKAINEN assure une très bonne séparation des hydrazones quel que soit le type de plaque de silicagel employé. La formation d'isomères est minime, le temps de migration très court.

Il est à remarquer que les acides 2 oxo-isovalérique et 2 oxo-isocaproïque ne sont bien isolés que sur plaque de silicagel 1500 S Schleicher et Schüll.

Après nos essais, nous préconisons donc la modalité opératoire ci-dessous :

- support : plaque de silicagel avec amidon comme liant.
- solvant de RONKAINEN : acide propionique, formiate d'éthyle, éther de pétrole (30-70-140 v/v).
- temps de migration : 60 à 90 minutes.

1.3. DOSAGES

- - - -

1.3.1. Non spécifiques

a) Spectrophotométrie

- . dinitrophénylhydrazone
- . 3 méthyl-2 benzothiazolone-hydrazone (441)
- . complexe émol-borate des acides phénylpyruvique et para-hydroxyphénylpyruvique

b) Fluorimétrie

- . Quinoxaline par condensation avec l'o-phénylène-diamine (447, 476)
- . Résorcinol, naphtol (469)

1.3.2. Spécifiques pour certains 2-oxo acides

- . Enzymatiques : pyruvate (94, 181, 287, 335, 357, 358, 461)
2-oxoglutarate (33, 454)
acétoacétate (511)
oxaloacétate (174)
- . Extraction sélective : acide phénylpyruvique (38)
- . Transformation du composé : acide p.hydroxyphényl-pyruvique
(donnant le p.hydroxybenzaldéhyde) (212).
- . Réactions colorées spéciales : acide phénylpyruvique et
imidazolpyruvique avec les réactifs des phénols.

1.3.3. Essais personnels

Nous avons tenté de doser les 2 oxo acides en déposant des quantités croissantes d'hydrazones de l'acide pyruvique en parallèle avec les hydrazones urinaires. Les spots sont récupérés par grattage et élués par 3 ml d'une solution de carbonate disodique à 10 %. Après centrifugation, la lecture est effectuée à 380 nm en cuve de 1 cm.

Nous avons utilisé la méthode de dosage de l'acide pyruvique par formation de quinolaxines fluorescentes en milieu sulfurique et à chaud (395, 447). Nos essais n'ont pas été poursuivis par manque de spécificité de la méthode. La purification des 2 oxo acides sous forme libre nécessitant la mise en oeuvre de techniques très complexes, nous avons mis en route le dosage enzymatique de l'acide pyruvique. Il est également limité par la concentration très faible de ce 2-oxo acide dans les tissus.

Les concentrations sont variables selon les conditions expérimentales, la race de l'animal, son poids, la nature du tissu analysé, l'état de jeûne, le traitement, les rythmes saisonniers. Les chiffres relevés dans la littérature varient de 80 à 100 μM de pyruvate par kg de foie de rat (25, 216) lorsque le jeûne atteint 18 heures. STÖRMER trouve une concentration de 150 $\mu\text{M}/\text{kg}$ chez l'animal alimenté et 170 $\mu\text{M}/\text{kg}$ lorsqu'il est à jeûn depuis 12 heures (457).

La dispersion des résultats du dosage de ce 2-oxo acide dans les tissus est due à sa labilité. Les substrats oxydés sont capables de se réduire spontanément, d'autant plus qu'ils sont à de faibles concentrations, dans un milieu où les substrats réduits sont présents dans de fortes proportions. La rapidité du prélèvement du matériel biologique, la congélation brutale dans de l'azote liquide, le broyage dans l'acide perchlorique et la neutralisation ne suffisent pas à inhiber complètement les activités enzymatiques (25).

CHAPITRE II

SEPARATION ET DOSAGE DES AMINO-ACIDES

Après les 2-oxo-acides, nous avons mis en route, au laboratoire, le dosage automatique des amino-acides.

Parmi les différents systèmes disponibles, nous avons le choix entre :

- la colonne unique avec élution continue par un gradient de pH et de force ionique selon la méthode de PIEZ et MORRIS (365)
- le système à deux colonnes selon la méthode de MOORE, SPACKMAN et STEIN (323, 324, 446) avec élution par étapes.

Nous avons choisi la méthode de PIEZ et MORRIS avec analyse automatique de l'éluat. Elle met en oeuvre un appareillage plus simple, avec un seul dépôt d'échantillon.

Les acides aminés sont élués sélectivement par deux solutions tampon de citrate de sodium selon la méthode décrite par EFRON (122).

2.1. PRINCIPE

Les acides aminés sont fixés sur une colonne de résines échangeuses d'ions à pH acide. Ils sont élués sélectivement par des solutions tampon de citrate de sodium. Celles-ci contiennent du thiodiglycol pour protéger les radicaux soufrés de la cystine et de la méthionine et diminuer le pouvoir oxydant de la résine.

L'éluat est analysé en continu. Les acides aminés à pH 5 et à 95°C donnent une coloration violette avec la ninhydrine. Cette réaction a lieu en présence d'un réducteur : hydrindantine, sulfate d'hydrazine, chlorure stanneux ou acide ascorbique. Le maximum d'absorption se situe à 570 nm. Seules, la proline et l'hydroxyproline forment un complexe coloré en jaune avec la ninhydrine dont le maximum d'absorption est à 440 nm. L'enregistrement se fait directement sur papier semi-logarithmique.

2.2. REACTIFS

Réactif I : Solution tampon pH 2,875

Citrate de sodium 0,05 M	14,71 g
Soude 2 N	25 ml
Thiodiglycol	5 ml
Brij 35 en solution à 10 %	10 ml
Eau bidistillée environ	900 ml

Ajuster à pH 2,875 avec de l'acide chlorhydrique 6 N.
Compléter à 1 000 ml avec de l'eau bidistillée.

Conservation trois semaines à +4°C. Vérifier régulièrement le pH de la solution.

Une partie de cette solution est utilisée pour régénérer la colonne. Elle doit être protégée des vapeurs d'ammoniac par un flacon témoin contenant de l'acide sulfurique.

Réactif II : Solution tampon pH 4,74

Citrate de sodium 0,267 M	78,55 g
Eau bidistillée environ	950 ml
Brij 35 en solution à 10 %	10 ml

Ajuster à pH 4,74 avec HCl 6 N

Eau bidistillée qsp. 1000 ml

Conservation trois semaines à +4°C.

Réactif III : Solution d'acétate de sodium 4 N pH 5,5

Acétate de sodium anhydre..... 325 g

Dissoudre à chaud dans 700 ml d'eau bidistillée

Acide acétique glacial..... 100 ml

Eau bidistillée qsp. 1000 ml

Filtrer.

Conserver à l'abri de la lumière et à température ordinaire.

Réactif IV : Solution de ninhydrine

Ninhydrine	20 g
Méthylcellosolve.....	1500 ml
Acide acétique glacial.....	85 ml
Réactif III	300 ml
Eau bidistillée	3000 ml

Conservation à l'abri de la lumière, sous courant d'azote.

Réactif V : Solution de sulfate d'hydrazine

Sulfate d'hydrazine	0,780 g
Eau bidistillée.....qsp.	3 000 ml
Acide sulfurique concentré.....	3 gouttes

Conserver à +4°C à l'abri de la lumière.

Réactif VI : NaOH 0,2 NRéactif VII : Solution d'acide picrique à 1 %Réactif VIII : Azote R2.3. MATERIEL

Colonne de chromatographie liquide Technicon de 140 cm avec analyse automatique de l'éluat comprenant :

- des résines Chromobeads A
- une pompe Milton Roy
- un bain-marie à 60°C avec circulation d'eau (Colora)
- un Autograd à 9 chambres
- un Mannifold (figure 6)
- deux colorimètres à 440 nm et 570 nm
- un enregistreur à deux plumes

2.4. MODE OPERATOIRE2.4.1. Défécation

- . Matériel biologique 2 ml
- . Réactif VII 2 ml

Centrifuger.

Recueillir le surnageant, le diluer au demi dans le réactif VII.

2.4.2. Préparation de la colonne

- . Lavage de la résine : pomper le réactif VI pendant 45 minutes.
 - . Régénération de la résine : pomper le réactif I pendant 90 minutes.
- Vérifier que l'effluent de la colonne est à pH 2,875.

2.4.3. Préparation de l'Autograd

Remplir les conduits d'eau distillée avant de fermer les chambres.

N° des chambres	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Réactif I (ml)	75	75	75	75	75	15			
Réactif II (ml)						60	75	75	75

2.4.4. Dépôt de l'échantillon

- Vérifications préliminaires (check-list)

- . La température de la colonne (60°C)
- . La hauteur d'eau dans le bain-marie à circulation
- . Les quantités d'encre et de papier
- . La hauteur de résine dans la colonne. Vérifier plus particulièrement que le niveau supérieur de la colonne est propre et parfaitement plan
- . Le débit (0,6 ml/mm)
- . Le pH de l'effluent (2,875)

- Eliminer l'excès de tampon jusqu'à obtention d'un ménisque au-dessus de la colonne. Déposer 1 ml de défécant en évitant de perturber la surface de la résine. Faire pénétrer l'échantillon dans la résine en exerçant une légère pression d'air à l'aide d'une seringue. Remplir avec soin la colonne. Fermer rapidement en évitant toute bulle d'air.

2.4.5. Mise en route de la chromatographie

Brancher l'Autograd. Mettre son moteur en marche et ouvrir les vannes.

Mettre en marche la pompe Milton Roy.

Brancher le bas de la colonne sur le circuit analytique.

Observer la montée régulière de la pression dans la colonne. Régler la ligne de base sur les réactifs IV et V, 15 à 20 mm après la mise en route de l'élution.

La durée complète de la chromatographie est de 20 heures.

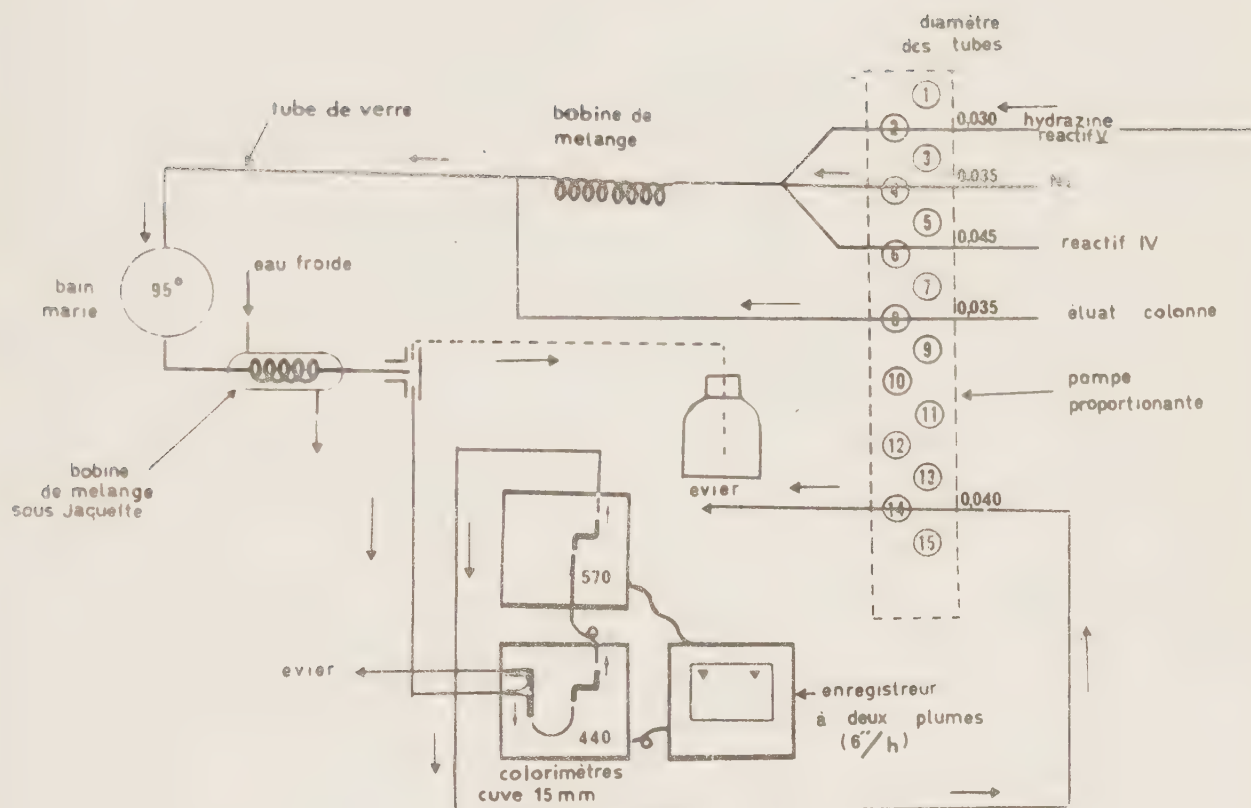


Figure 6 : Séparation par chromatographie sur colonne automatique des acides aminés. Diagramme des flux.

2.4.6. Arrêt de la chromatographie

Régénérer la colonne.

Rincer le circuit analytique avec de l'eau bidistillée additionnée de Brij 35 à 10 %.

2.5. ETALONNAGE

La reproductibilité est essentiellement fonction de la qualité du réactif à la ninhydrine et au sulfate d'hydrazine.

Une solution standard de 18 acides aminés est déposée régulièrement (2,5 µM/ml de chaque acide aminé).

Un standard interne, la norleucine, permet de vérifier la qualité des réactifs au cours de chaque chromatographie. Le rapport de la surface des pics de norleucine de la solution standard et du standard interne doit être de 1.

La reproductibilité des temps de rétention de chaque acide aminé dépend de la précision du pH des solutions d'élution.

2.6. CALCULS

Mesurer sur papier semi-logarithmique la hauteur H du pic, exprimée en densité optique.

Déduire la valeur h de la ligne de base.

$\frac{H - h}{2}$ représente la mi-hauteur réelle du pic.

Mesurer la largeur du pic (exprimée en centimètres) à mi-hauteur. Calculer les surfaces S de chaque acide aminé de la solution standard et de l'échantillon.

Soit T la surface du pic de norleucine de la solution standard et t la surface du pic de norleucine du jour (témoin interne).

La concentration en micromoles pour 100 ml d'un acide aminé est exprimée par la formule suivante :

$$\bar{c} = 0,25\mu\text{M} \times \frac{S}{s} \times \frac{T}{t} \times 100$$

Le résultat est affiché également en milligrammes pour 100 ml

$$(\bar{c} \times \frac{\text{poids moléculaire}}{1000})$$

2.7. RESULTATS OBTENUS

Nous présentons un chromatogramme standard dans la figure 7 ainsi qu'un chromatogramme d'un homogénat de foie dans la figure 8.

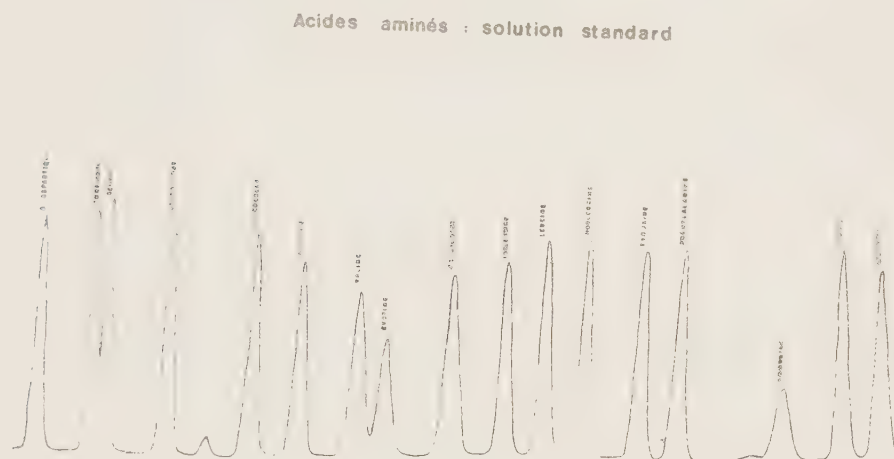


Figure 7 : Séparation par chromatographie sur colonne automatique des acides aminés d'une solution standard.

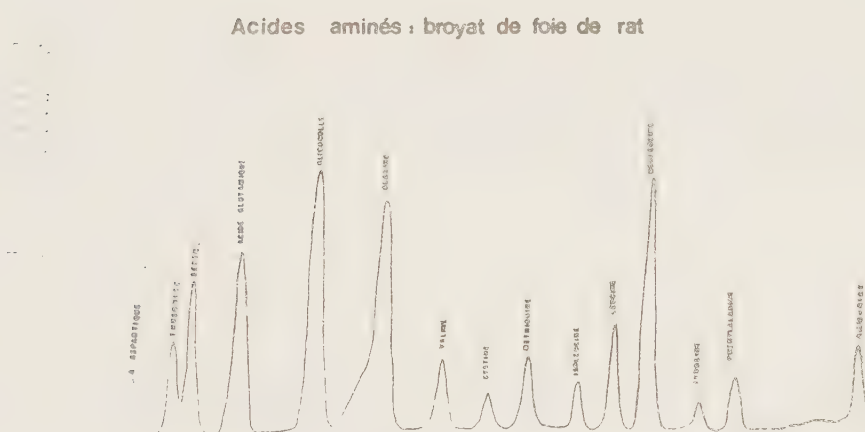


Figure 8 : Séparation par chromatographie sur colonne automatique des acides aminés d'un homogénat de foie de rat.

A 60°C, la glutamine et la sérine ne sont pas séparées. La résolution est meilleure si la colonne est maintenue à 37°C pendant 2 h 30 mn après le dépôt de l'échantillon ou à 60°C en utilisant des solutions de citrate de lithium.

CHAPITRE III

ENZYMES, IONS ET AUTRES METABOLITES

3.1. MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

En dehors de l'aspartate aminotransférase développée dans le deuxième chapitre, nous avons mesuré la MDH, la LDH et la GPT.

Certains problèmes techniques se sont posés à nous à cause :

- . du choix de la méthode
- . du choix de la température
- . du nombre important de dosages à effectuer
- . des appareils disponibles
- . du prix de revient des réactifs
- . de l'imprécision des méthodes dues à l'activité élevée des enzymes dans les milieux biologiques étudiés.

Nous utilisons la méthode cinétique qui permet de suivre l'activité des enzymes en continu, à partir du temps zéro de l'addition des substrats. Elle est plus spécifique, sensible, précise et rapide que la méthode colorimétrique correspondante, mais nécessite une standardisation plus poussée. Nos appareils répondent à cette condition.

3.1.1. Réactifs

Nous avons utilisé les coffrets de réactifs prêts à l'emploi : BOEHRINGER (Mannheim) en méthode spectrophotométrique.

MDH : n° 15981 TMAA

LDH : n° 15764 TLAM

GPT : n° 15752

3.1.2. Matériel

Le dosage de la LDH est effectué sur LKB 8600 à 340 nm et à 37°C.

La MDH est dosée sur l'ensemble microanalytique EPPENDORF à 30°C. Les lectures sont effectuées à 366 nm.

L'activité de la GPT est mesurée à 37°C sur AUTOMATE 5010 EPPENDORF.

3.1.3. Reproductibilité

Les résultats sont regroupés dans le tableau 6.

Nous avons dosé, la GPT et la LDH dans le plasma alors que la MDH n'est mesurée que dans les broyats tissulaires.

TABLEAU VI : REPRODUCTIBILITE DU DOSAGE DE LA GPT (37°C), LDH (37°C) ET MDH (30°C) PAR METHODE CINETIQUE.

	GPT (mU/ml de plasma)	LDH (mU/ml de plasma)	MDH (U/g de foie)
$\bar{m}$	20,6	180,3	545,5
n	48,0	50,0	24,0
s	0,41	3,55	36,8
cv %	2,0	1,98	6,7

3.2. DOSAGE DU LACTATE

Le lactate est l'un des substrats de la gluconéogénèse. Nous avons étudié les variations de ce substrat plutôt que celui du pyruvate car les niveaux de l'acide lactique dans le foie sont plus sensibles au jeûne que ceux du pyruvate (457). La même remarque peut être faite en comparant les résultats obtenus sur le sang de souris au cours d'un jeûne de 6 à 24 heures (396). La faible amplitude des variations du pyruvate est certainement due à sa concentration minime dans les tissus et à son instabilité in vitro au cours des dosages. L'acide lactique est à une concentration plus élevée dans le foie et le sang et sa stabilité est supérieure à celle du pyruvate.

3.2.1. Stabilité

Les prélèvements tissulaires doivent être plongés dans du fréon 12 jusqu'à -150°C . Les échantillons se conservent à -80°C . L'extraction du lactate a lieu à -20°C en pulvérisant le foie en présence d'acide perchlorique congelé. Les extraits neutralisés sont stockés à -80°C avant l'analyse (211, 344, 357). BARON (25) effectue le broyage dans un tampon phosphate 0,2 M nicotinamide. Il plonge aussitôt le tube dans l'azote liquide pour inhiber les réactions enzymatiques. Le reste des opérations a lieu à $+2^{\circ}\text{C}$. SCHMIDT (415) utilise une méthodologie plus simple. Le tissu est plongé dans de l'acide perchlorique glacé pour inhiber les systèmes enzymatiques.

Des précautions très strictes doivent être observées pour le dosage du lactate sanguin. Le sang est déprotéinisé par de l'acide perchlorique glacé immédiatement après le prélèvement (211, 321, 344, 348) ou immédiatement centrifugé (357, 495). TEAFORD (460) constate cependant une bonne stabilité de l'acide lactique pendant 72 heures à $+4^{\circ}\text{C}$.

3.2.2. Méthodes de dosage existantes

Les méthodes de dosage sont très voisines dans l'ensemble.

La défécation perchlorique est généralement admise dans les techniques manuelles. Après centrifugation à grande vitesse, les surnageants sont neutralisés par de la soude (321), de la potasse (335, 344, 495), du bicarbonate de potassium (348) ou du carbonate de potassium (150, 211).

3.2.2.1. Méthodes spectrophotométriques ou fluorimétriques

Le dosage du lactate est basé sur la réaction suivante :



L'oxydation du lactate est favorisée à pH alcalin voisin de 9,5 (150).

L'extinction du NADH est mesurée par spectrophotométrie (150, 211, 321, 344, 392, 461), fluorimétrie (277, 348, 357) en méthode manuelle ou automatique (92, 158, 181).

La réaction a lieu en présence d'hydrazine pour "piéger" le pyruvate présent dans le milieu et celui formé au cours de la réaction enzymatique (25, 150, 211, 321, 335, 348, 461).

La mesure est effectuée au plateau de l'activité de l'enzyme entre deux temps définis. La hauteur du plateau est insensible à de faibles changements de la concentration de la LDH ajoutée (25). Bien que le temps de contact soit très long (20 à 60 mn), cette mesure ne nécessite pas d'enregistrement en continu et la durée réelle de la manipulation est courte.

La mesure d'un blanc doit être effectuée pour chaque dosage. En effet, le surgelage et l'extraction par l'acide perchlorique, ne suffisent pas à inhiber complètement les systèmes enzymatiques présents dans le milieu (25). De plus, les acides organiques (acide malique, acide glycérique, acide pyruvique) interfèrent dans le dosage.

L'étalonnage est réalisé soit :

- . à partir de concentrations croissantes de solutions étalons
- . en fonction d'un étalon interne ajouté à l'extrait

Certaines modifications sont apportées à cette méthode.

NOLL transforme le pyruvate apparu en alanine par une réaction de transamination (344).

Le lactate est encore dosé par formation d'un complexe énoiborate absorbant dans la zone UV (80).

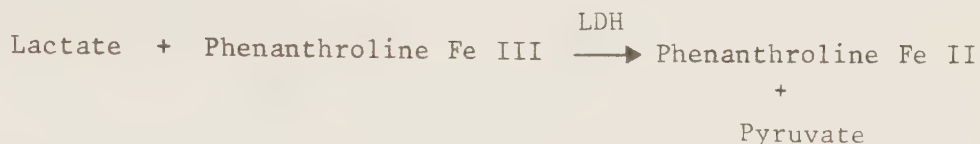
3.2.2.2. Méthodes colorimétriques

Le NADH formé est couplé à un transporteur d'électrons, l'INT avec formation de formazan réduit en présence de diaphorase, selon le schéma suivant :

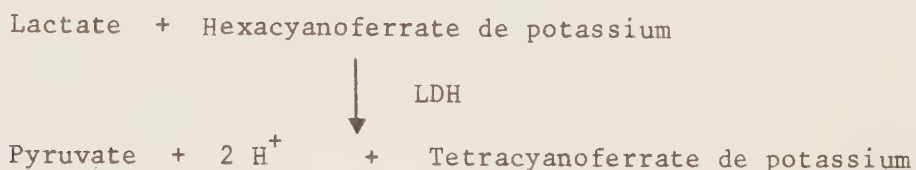


Cette technique est adaptée en automatique par HOCELLA (206).

Deux méthodes colorimétriques sont proposées par WIELAND (495)



La réaction colorée est mesurée à 436 nm.



L'absorption est lue à 405 nm.

3.2.2.3. Méthode de dosage en chromatographie en phase gazeuse

Le lactate sanguin est oxydé après déprotéinisation, par du sulfate cérique, en acétaldéhyde. Il est chromatographié sous cette forme sur une colonne SE 30 siliconée, à 75°C (460).

Parmi les méthodes proposées, notre choix s'est porté sur la méthode spectrophotométrique, en présence d'hydrazine, adaptée en méthode semi-automatique.

3.2.3. Méthode utilisée

3.2.3.1. Réactifs

- Réactif I - Acide perchlorique 0,6 N
- Réactif II - Coffret BOEHRINGER ; lactate Réf. 15972 TLAA
- Réactif III - Solution étalon de lactate BOEHRINGER Réf. 15672 TYAK
- Réactif IV - La gamme d'étalonnage est établie par dilution de cette solution étalon dans l'acide perchlorique pour obtenir des concentrations finales de 22,5 ; 45 ; 90 ; 180 mg/l.

Pour le contrôle journalier, nous utilisons la solution à 45 mg/l répartie en fractions et congelée à -20°C.

3.2.3.2. Matériel

- . Broyeur Ultra-Turrax
- . Centrifugeuse réfrigérée Janetzki
- . Ensemble microanalytique Eppendorf 1100 M thermostaté à 25°C

3.2.3.3. Mode opératoire

Foie prélevé immédiatement après la mort de l'animal 1 g
Acide perchlorique 0,6 N glacé 4 ml

Broyer pendant 30 secondes en maintenant le tube dans la glace, avec un appareil Ultra-Turrax. Arrêt de 45 secondes puis broyer à nouveau 30 secondes.

Centrifuger 20 minutes à +4°C et à 14000 g.

Recueillir le surnageant et le maintenir dans la glace.

Le dosage est effectué rapidement.

		Témoin	Dosage
Solution 1 (R.II)	μ l	500	500
Surnageant	μ l		50
Acide perchlorique 0,6 N (R. I)	μ l	50	
Solution 2 (R.II)	μ l	50	50
Solution 3 (R.II)	μ l	5	5

Incuber une heure à 25°C.

Lire à 366 nm en micro-cuve de un cm de trajet optique.

Etablir la gamme d'étalonnage dans les mêmes conditions en remplaçant le surnageant par les dilutions de la solution étalon de lactate (R. IV).

3.2.3.4. Reproductibilité

Nous avons établi la reproductibilité du dosage sur un point de gamme d'étalonnage , à 45 mg/l.

$$\bar{m} = 45,8 \text{ mg/l} \quad s = 1,2$$

$$n = 18 \quad \text{cv \%} = 2,7$$

Le même contrôle est effectué sur un point de dosage de lactate, dans le foie de rat.

$$\bar{m} = 69,4 \text{ mg/l} \quad s = 2,2$$

$$n = 18 \quad \text{cv \%} = 3,1$$

La gamme d'étalonnage est établie une fois par semaine.

3.3. DOSAGE DU GLUCOSE

3.3.1. Méthodes utilisées

Nous avons dosé le glucose dans le sang de rats par la méthode à l'o.toluidine après défécation trichloracétique (217).

Au cours de notre étude chez l'homme diabétique, la glycémie a été dosée par la méthode à la glucose oxydase, adaptée sur SMA 12/60 Technicon.

3.3.2. Reproductibilité

La reproductibilité journalière de la méthode à l'o.toluidine est la suivante :

$$\bar{m} = 1,007 \text{ g/l} \quad s = 0,019$$

$$n = 50 \quad \text{cv \%} = 1,9$$

Celle à la glucose oxydase est de :

$$\bar{m} = 0,83 \text{ g/l} \quad s = 0,03$$

$$n = 36 \quad \text{cv \%} = 3,6$$

3.4. DOSAGE DES PROTEINES

3.4.1. Méthodes utilisées

Nous avons utilisé les méthodes de LOWRY (279) et d'ARDRY (17). Nous avons dosé les protéines au cours des étapes successives de purification de l'aminotransférase dans les homogénats de foie de rat par la méthode de LOWRY.

L'étalonnage est réalisé avec une solution d'albumine bovine à 10 g % diluée pour obtenir des concentrations de 0,025, 0,10, 0,20, 0,25, 0,50 et 1 g/litre.

Nous avons adopté également cette méthode pour doser les protéines mitochondriales. En effet, la méthode de LOWRY a été préconisée par BENGAL (28) pour doser les protéines dans les suspensions de mitochondries riches en lipides. Sa sensibilité est supérieure à celle de la méthode de GORNALL ou de KJELDAHL.

EICHBERG (123) précise que les lipides interfèrent faiblement dans le dosage des protéines par la méthode de LOWRY lorsqu'ils sont à l'état natif. Par contre, après oxydation, l'erreur par excès est considérable.

ROSENTHAL (393) observe une coloration plus intense avec des homogénats tissulaires dans le saccharose. Elle est plus importante lorsque le dosage est effectué après 24 heures. Cette interférence est levée par dialyse. En présence d'ions par contre, ROSENTHAL note une inhibition de la réaction colorée.

Les polymères du saccharose tels que le Ficoll (272) inhibent également la réaction colorée. Cette inhibition n'est pas levée par un excès de réactif cuivrique.

Le glycogène et le dextrane n'interfèrent pas (48).

Le glucose et le fructose donnent des blancs réactifs de valeur élevée mais interfèrent peu avec le dosage des protéines proprement-dit (393) à des concentrations inférieures à 0,4 g/litre.

D'autres erreurs par excès sont signalées avec l'acétylacétone, l'acétone, l'alcool, l'acide acétique, les détergents, les acides inorganiques et les alcalis, les hydrazines, les salicylates, certains antibiotiques, le dithionite de sodium, l'acide 5 aminolévulinique, l'acide lévulinique, l'acide ascorbique, l'histamine, le TRIS (à une concentration supérieure à 0,1 M) (48, 363), les composés phénoliques, la tyrosine, le tryptophane, l'acide urique, la guanine et la xanthine, la cystéine (48, 279).

Nous-mêmes avons constaté une interférence importante dans le dosage des protéines mitochondriales en présence de biguanides. Pour effectuer ces mesures, nous avons donc choisi la méthode classique du biuret selon ARDRY (17). Une interférence du saccharose est décrite par ARORA (18). La spécificité de la méthode est améliorée en dosant les protéines après précipitation par l'acide perchlorique.

Toutefois dans la méthode originale, l'erreur est minime pour une concentration en protéines supérieure à 500 μg dans la prise d'essai et à des concentrations élevées de saccharose.

Notre mode opératoire répond à ces conditions. En effet, les dosages sont effectués à partir d'une suspension de mitochondries dans le mannitol 0,3 M. Après dilution au demi dans l'eau distillée, la prise d'essai contient de 1000 à 1500 μg de protéines mitochondriales.

3.4.2. Reproductibilité

La reproductibilité de la méthode de LOWRY a été établie sur le premier surnageant d'un homogénat de foie de rat.

$$\begin{array}{ll} \bar{m} = 196 \text{ mg/g} & s = 7 \\ n = 30 & \text{cv \%} = 3,6 \end{array}$$

Le dosage des protéines mitochondriales est effectué par la méthode au biuret. Le coefficient de variation obtenu pour cette méthode est proche de celui obtenu avec la méthode de LOWRY respectivement, 2,4 et 2,3 %.

3.5. CATIONS

Les biguanides étant des agents chélateurs, nous avons jugé utile de suivre le taux des métaux dans les liquides biologiques, avant et après traitement.

De plus au cours des essais in vitro et in vivo, les phénomènes de perméabilité impliquent également les cations monovalents.

3.5.1. Magnésium et calcium

3.5.1.1. Méthode utilisée

Ces deux métaux sont dosés par absorption atomique sur un appareil JOBIN YVON, modèle KUHLMANN.

3.5.1.2. Reproductibilité

Le coefficient de variation du magnésium au cours d'une journée est de 1,5 à 2 %. Il est de 3,7 lorsque nous comparons les moyennes de jour à jour.

Celui du calcium est très voisin puisque le coefficient de variation journalier est de 1,5 %.

3.5.2. Sodium et potassium

3.5.2.1. Méthode utilisée

Nous avons effectué les dosages sur un photomètre de flamme IL.

Dans le cas du potassium, nous n'avons exploité que les résultats correspondants à un même lot de réactifs du début à la fin des essais.

3.5.2.2. Reproductibilité

Le coefficient de variation dans le cas du sodium est de 0,25 % et dans le cas du potassium 1,04 %.

CHAPITRE IV

TECHNIQUES PARTICULIERES

4.1. ULTRACENTRIFUGATION

4.1.1. Matériel

- . Homogénéiseur type Potter Elvehjem
- . Ultracentrifugeuse Beckman Spinco 50 B avec rotor 50 (rayon moyen : 5,4 cm)
- . Centrifugeuse réfrigérée Janetzki

4.1.2. Extraction de la GOT - Fractionnement subcellulaire

Ces méthodes seront développées dans la deuxième partie de notre travail.

4.2. MESURE POLAROGRAPHIQUE DE L'OXYGENE

4.2.1. Principe

DAVIES (102) a rassemblé et étudié les bases théoriques de la méthode polarographique et les a appliquées à l'utilisation de "la cathode à O_2 ". Cette électrode à O_2 , du type électrode de CLARK, est constituée essentiellement d'une cathode de platine et d'une anode de référence plongeant dans un milieu d'électrolyse constitué par une solution de KCl demi-saturée. Cet ensemble est séparé du milieu d'incubation saturé en O_2 par une fine membrane de polyéthylène.

Lorsque l'on crée une tension de polarisation de 0,8 V entre ces deux électrodes, l'oxygène subit une réduction électrolytique à la surface du platine (cathode). L'intensité du courant d'électrolyse ainsi produit est proportionnelle à la concentration de l' O_2 dans la solution.

CHANCE et WILLIAMS (71) ont appliqué cette méthode à l'étude de la respiration au niveau de la fraction mitochondriale.

4.2.2. Matériel

- . Oxygraphe Gilson modèle KM avec micro-électrode de Clark
- . Cellule de volume 1,6 ml
- . Vitesse de déroulement du papier 0,5 mm/seconde
- . Microseringues AGLA [°]
- . Bain-marie à circulation d'eau "Heto" avec ultrathermostat

4.2.3. Réactifs

Réactif I - Milieu polarographique (158, 354)

Mannitol °° 0,3 M	27,32	g
EDTA potassique Fluka 0,2 mM	0,03724	g
Tris Boehringer (réf.15326 HTAB) 0,01 M	0,6057	g
Phosphate monopotassique Merck 0,005 M	0,34	g
Chlorure de potassium Merck 0,01 M	0,3728	g
Eau bidistillée environ.....	450	ml

Ajuster à pH 7,4 avec une solution de potasse.

Compléter à 500 ml avec l'eau bidistillée.

Conservation une semaine à +4°C.

Réactif II - Acide glutamique 0,5 M

Acide glutamique.....	147,13	mg
R.I.	qsp. 2	ml

Ajuster à pH 7,4 avec une solution de potasse.

Conserver 4 heures dans la glace.

Réactif III - ADP 12,5 M

ADP Boehringer (réf. 15016 NAAF).....	10,68	mg
R.I.	qsp. 2	ml

Ajuster à pH 7,4 avec une solution de potasse.

Conserver 4 heures dans la glace.

- ° Société DANNATT - 198, rue Saint Jacques 75011 PARIS
- °° Société "LA ROQUETTE" - 17, boulevard Vauban 59000 LILLE

4.2.4. Méthode utilisée

Les mesures sont effectuées à 25°C, immédiatement après le fractionnement subcellulaire, sur la fraction mitochondriale.

Le milieu polarographique est agité en permanence sur un agitateur magnétique. Il est incubé pendant cinq minutes dans la cellule où le gain d'amplification est réglé de sorte que la déflection maxima de l'enregistreur corresponde à la saturation en oxygène du milieu.

La cellule est alors fermée par un bouchon traversé par un conduit capillaire, de manière à isoler le milieu de réaction de l'atmosphère, comme l'a préconisé HAGIHARA (190).

Huit à dix milligrammes de protéines mitochondriales sont introduites rapidement et incubées pendant trois minutes. La respiration des mitochondries est suivie pendant une minute après addition de 20 μ l de substrat (R.II), puis de 20 μ l d'ADP (R.III) à l'aide de microseringues Agla, à travers le conduit capillaire du bouchon de la cellule.

4.2.5. Mesures

4.2.5.1. Dosage de l'O₂ dissous dans le milieu polarographique saturé d'air

Nous avons déterminé la quantité d'O₂ dissous par le dosage iodométrique de NICLOUX (336), adaptation de la méthode mise au point par WINKLER (502).

La teneur moyenne en O₂ en solution à 25°C dans le milieu polarographique utilisé pour l'expérimentation est de 450 nano-Atomes-grammes par millilitre de milieu.

Le volume final étant de 1,60 ml, la déflection de 100 à 0 de l'enregistreur correspond à la consommation de $450 \times 1,6 = 720$ nano-Atomes-grammes d'O₂.

4.2.5.2. Détermination du rapport $\frac{ADP}{O}$

Ce rapport consiste à mesurer la quantité d'O₂ utilisée, proportionnelle à l'augmentation d'ADP phosphorylé en ATP, selon la méthode de CHANCE et WILLIAMS (71).

Cette détermination permet d'apprécier l'efficacité du couplage de la respiration à la synthèse d'ATP.

Le rapport $\frac{ADP}{O}$ a été calculé à partir de la formule donnée par ESTABROOK (127) :

$$\frac{ADP}{O} = \frac{ADP}{O} \times \frac{X}{x \ y}$$

ADP = quantité d'ADP ajouté

X = déflexion totale d'O₂

O = consommation de nano-Atomes d'O₂ (oxygène total)

y = déflexion correspondant à la conservation d'O₂ pendant l'état actif

4.2.5.3. Détermination de l'indice de contrôle respiratoire

Cet indice a été défini par CHANCE et WILLIAMS (71) comme étant la valeur donnée par rapport à la vitesse de respiration dans l'état actif 3 et dans l'état 4.

Il est donc égal à $\frac{y}{z}$ (figure 9).

4.2.5.4. Reproductibilité

Elle est essentiellement fonction de la qualité du fractionnement subcellulaire. Nos mesures sont effectuées sur des mitochondries de foie de rat à jeûn 20 heures. Dans les conditions décrites, le rapport $\frac{ADP}{O}$ moyen calculé sur 32 essais réalisés à des jours différents est de 1,91 (+ 0,22). L'indice de contrôle respiratoire est de 1,81 (+ 0,22). La dispersion sur un jour est nettement moins élevée (tableau 7).

TABEAU VII : REPRODUCTIBILITE JOURNALIERE DE LA MESURE DE LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE PAR POLAROGRAPHIE ($\bar{m} \pm s$)
(Les mitochondries sont isolées à partir d'un foie de rat à jeûn depuis 20 heures).

	Protéines (mg dans la cellule)		$\frac{ADP}{O}$		$\frac{y}{z}$	
	Essai n° 1	Essai n° 2	Essai n° 1	Essai n° 2	Essai n° 1	Essai n° 2
n	10	14	6	6	6	6
$\bar{m}$	9,20	7,90	1,86	1,89	1,92	1,79
s	0,24	0,18	0,08	0,13	0,22	0,13

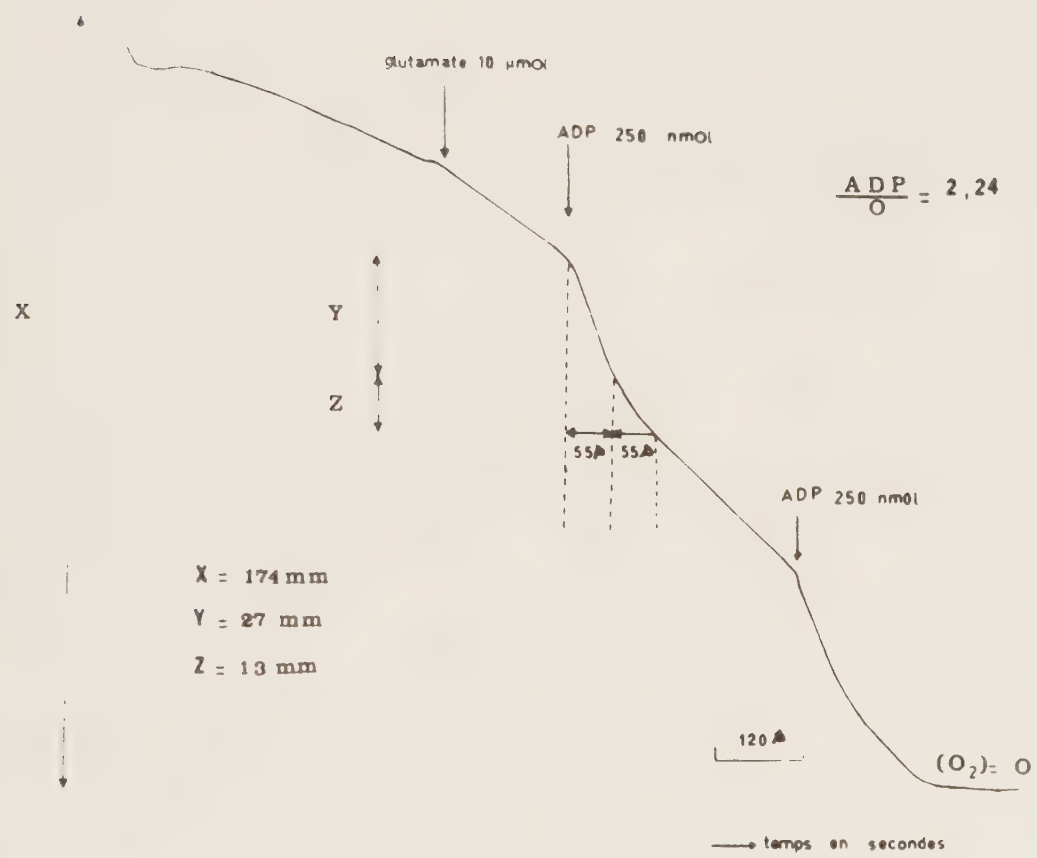


Figure 9 : Mesure de la respiration des mitochondries par polarographie

4.3. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

4.3.1. Principe

L'examen au microscope électronique est une méthode morphologique qui permet d'une part, d'identifier la fraction subcellulaire considérée, d'autre part d'en apprécier l'homogénéité et la pureté.

Après fixation du sédiment mitochondrial dans le glutaraldéhyde et l'acide osmique, inclusion dans l'épon et coloration par l'acétate d'uranyle, les coupes sont observées au microscope électronique.

Parmi les nombreuses techniques offertes, nous avons utilisé la technique de FAHIMI et coll. pour la fixation (134) et celle de LUFT (280) utilisant l'épon 812.

4.3.2. Matériel et méthodes

4.3.2.1. Appareils

- . Appareil à tailler les blocs Reichert TM 60
- . Ultramicrotome Reichert automatique, à avance thermique, donnant des coupes à 1000 Å d'épaisseur
- . Microscope électronique

4.3.2.2. Réactifs

Réactif I - Glutaraldéhyde à 2,5 % dans tampon phosphate 0,1 M
pH = 7,4

Préparation extemporanée

Dans un récipient :

- . Glutaraldéhyde 25 % dans eau "Fluka"..... 25 ml
- . Eau distillée..... 100 ml

Agiter

- . NaOH N qsp. pH 7,4
- . Phosphate monosodique..... 1,95 g
- . Phosphate disodique..... 4,48 g
- . Eau distillée..... 100 ml

Ajuster à pH = 7,4 avec NaOH N

Compléter à 250 ml avec de l'eau distillée

Préparation extemporanée

Réactif II - Solution de lavage

. Saccharose Merck L.A.B.....	8,557 g
. Phosphate monosodique.....	0,78 g
. Phosphate disodique.....	1,79 g
. Eau distillée.....qsp.	100 ml

Réactif III - Acide osmique 1 % dans tampon phosphate 0,1 M

Préparer au moins 24 heures avant usage

. Phosphate monosodique.....	0,195 g
. Phosphate disodique.....	0,448 g
. Eau distillée.....qsp.	25 ml

Agiter

. Tetraoxyde d'osmium "Fluka".....	1 ampoule de 250 mg
------------------------------------	------------------------

Dissoudre peu à peu avec les 25 ml de tampon
phosphate 0,1 M

Bien agiter

Verser dans un flacon brun, fermé hermétiquement
(stable deux mois)

Réactif IV - Produits de contraste

- . Acétate d'uranyle à 1 %
- . Reynolds : (citrate de sodium + nitrate de plomb)

Réactif V - Produits d'inclusion

- . Epon préparé à partir de
 - epikate 812
 - anhydride succinique de dodecenyle
 - méthylanhydride nadic
 - DMP 30 (durcisseur)

4.3.2.3. MéthodeFixation au glutaraldéhyde et lavage

Le sédiment mitochondrial est recouvert d'une fine pellicule de glutaraldéhyde (Réactif I) à la température de 4°C. Quant ce culot est solidifié, il est découpé en petits cubes de 1 mm d'arête environ, placés de nouveau dans le glutaraldéhyde frais.

La fixation se poursuit pendant deux heures à +4°C avec agitation de la solution tous les quarts d'heure.

La qualité de la fixation dépend de plusieurs facteurs :

- . pH de la solution (généralement pH 7,2 - 7,4)
- . de la force ionique
- . de la présence de certains ions
- . de la température (entre 0°C à +4°C)
- . de la durée

Nous procédons ensuite au lavage à l'aide du réactif II, après élimination du glutaraldéhyde.

- . Un premier lavage rapide est d'abord effectué
- . Puis un bain d'une heure avec agitation au bout de 30 mm
- . Un deuxième bain de deux heures
- . Un troisième bain se prolonge toute la nuit.

Post-fixation à l'acide osmique et déshydratation

Après élimination de la solution de lavage (réactif II), nous ajoutons 1 ml d'acide osmique (réactif III) et nous laissons en contact pendant une heure avec agitation toutes les 10 minutes.

L'acide osmique est retiré et nous procédons à la déshydratation :

- . par bains successifs de 5 minutes dans les solutions d'alcool à 30°, 50°, 70°, 80° et 90°
- . puis par trois bains de 20 minutes dans l'alcool absolu
- . enfin par trois bains de 20 minutes dans du propylène oxyde afin de parfaire la déshydratation.

Inclusion

Il est nécessaire d'inclure les mitochondries dans un support solide, de manière à effectuer les coupes : nous utilisons l'épon 812.

Les pièces sont placées dans un mélange intermédiaire :

- . 1 volume de propylène)
- . 1 volume d'épon) pendant une heure

Puis elles sont placées dans des salières avec de l'épon pendant une nuit.

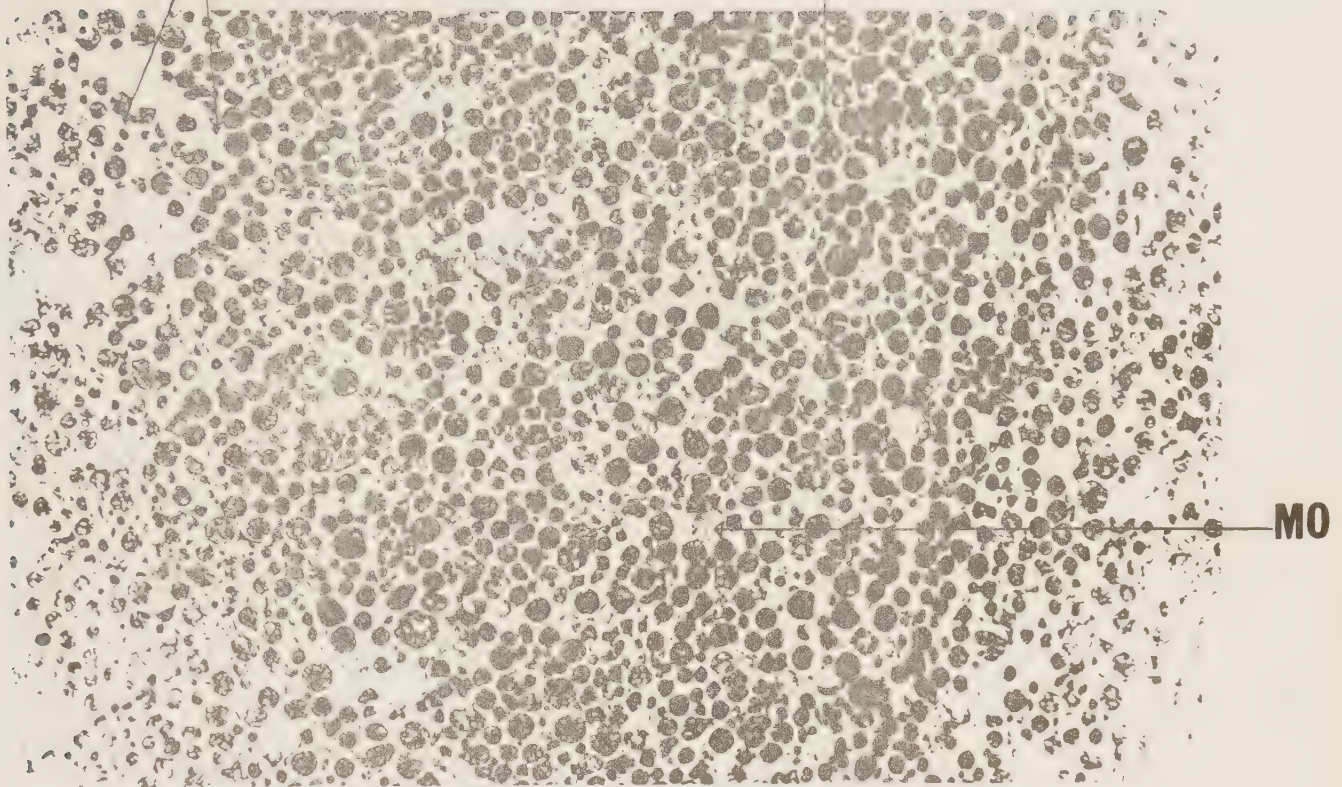


Figure 10 : Fraction mitochondriale isolée à partir d'un foie de rat à jeûn pendant 20 heures, à faible grossissement : G x 1520 (I : Impuretés, MO : Mitochondrie orthodoxe, Ma : Mitochondrie "active").

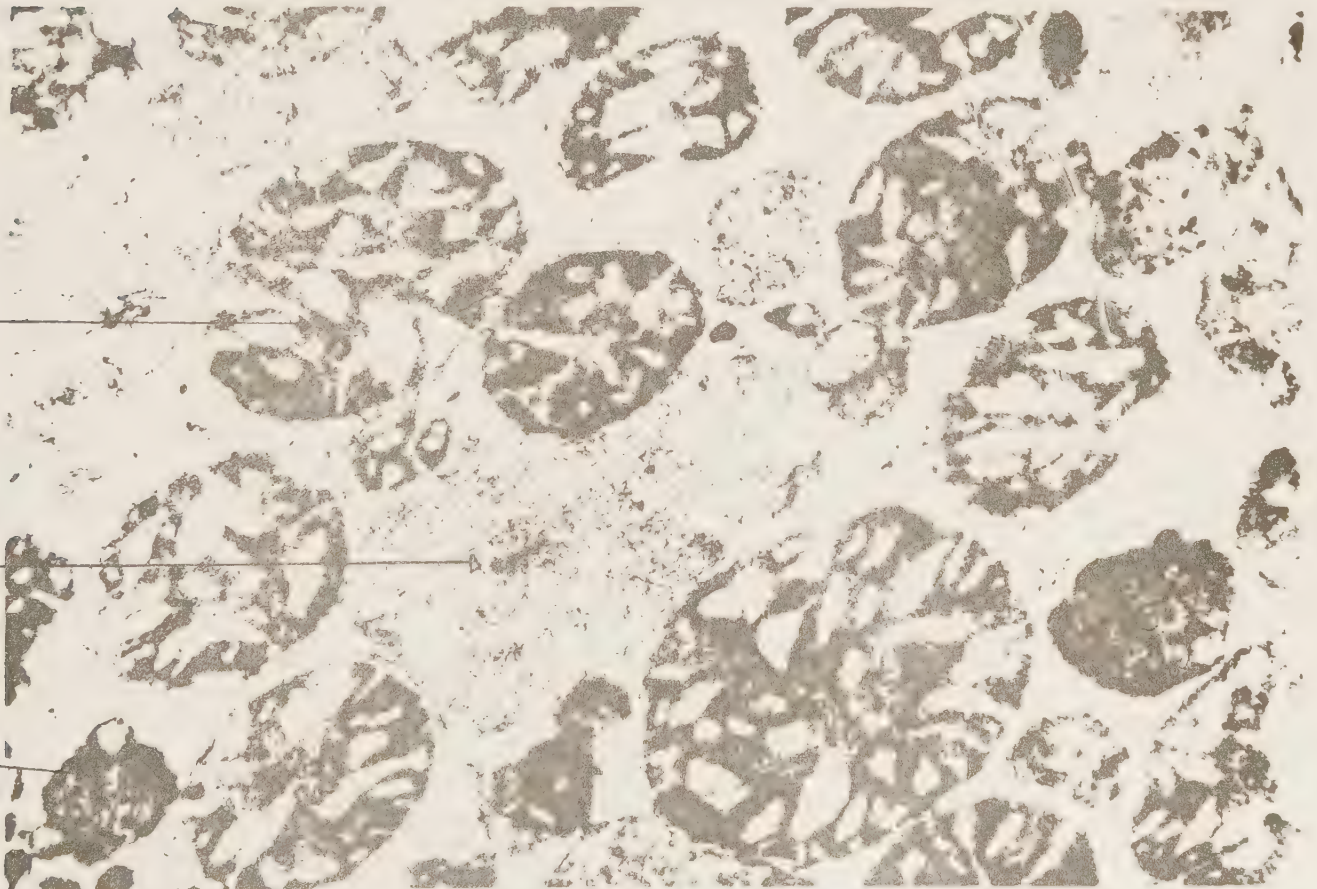


Figure 11 : Fraction mitochondriale à plus fort grossissement : G x 46500 (I : Impuretés, MO : mitochondrie orthodoxe, Ma : mitochondrie "active").

Le lendemain, l'inclusion est réalisée dans des gélules avec l'épon 812.

Les gélules sont laissées toute la journée à la température du laboratoire, puis mises à l'étuve à +56°C pendant trois jours au minimum.

L'épon se polymérise et de l'état visqueux, il passe à l'état solide.

Préparation des coupes "coloration" et observations

Les blocs sont taillés en pyramide à l'aide d'un appareil automatique : le TM 60 Reichert.

Les coupes d'épaisseur de 1 000 Å environ, sont obtenues avec le microtome automatique Reichert. Ces coupes s'étalent à la surface de l'eau et sont recueillies sur de petites grilles de téflon.

Le contraste, indispensable pour l'observation, est réalisé en plongeant successivement les grilles dans deux bains :

- . 15 minutes dans de l'acétate d'uranyle à 1 %
- . 15 minutes dans le Reynolds

Les grilles sont ensuite rincées à l'eau distillée.

L'observation se fait au microscope électronique qui permet de prendre des clichés.

4.3.3. Résultats

L'observation au microscope électronique nous permet de vérifier la composition de la fraction mitochondriale isolée précédemment, ainsi que de détecter et d'évaluer les contaminations possibles (figure 10) ou les artefacts introduits pendant l'homogénéisation.

Avec l'observation au plus fort grossissement, il est possible de conclure à l'obtention de mitochondries entières (figure 11).

CHAPITRE V

MATERIEL BIOLOGIQUE ET TESTS STATISTIQUES UTILISES

5.1. MATERIEL BIOLOGIQUE HUMAIN

Le sang est prélevé sur héparinate de lithium et centrifugé immédiatement.

Les dosages sont faits sur le plasma. Nous établirons cependant des corrélations avec les valeurs obtenues sur sérum.

Nous avons également utilisé le sang total pour le dosage du magnésium et de la GOT globulaire.

5.2. MATERIEL BIOLOGIQUE ANIMAL
-----5.2.1. Animaux utilisés

La mise au point de nos techniques et l'étude du mode d'action des biguanides hypoglycémiantes ont été faites sur le rat.

5.2.1.1. Conditions générales d'élevage des animaux de laboratoire

Le métabolisme est fonction de l'âge, du sexe, mais aussi des facteurs d'environnement :

- . Température
- . Pression
- . Degré hygrométrique
- . Rythme circadien
- . Climat
- . Alimentation
- . Isolement
- . Bruit
- . Odeurs
- . Stérilité
- . Construction de la cage, etc...

Pour maîtriser les effets des rythmes circadiens et saisonniers, il est important d'aménager l'animalerie dans une enceinte thermostatée dotée d'un cycle lumineux artificiel. De plus, il est souhaitable d'acclimater les animaux achetés pendant une à trois semaines. Ce délai permet d'éliminer les animaux mal adaptés ou malades. L'eau est fournie à volonté car une privation de 24 heures provoque des lésions irréversibles pouvant entraîner la mort de l'animal.

5.2.1.2. Problèmes particuliers au rat

Il est particulièrement sensible à la lumière. Les alternances de lumière doivent être standardisées.

Le rat doit être isolé dans une cage à fond grillagé au moment de la mise à jeûn car il est coprophage. L'état de jeûne se vérifie en examinant le contenu de l'estomac après la mort de l'animal.

5.2.1.3. Animaux utilisés au cours de notre expérimentation

Des lots de rats mâles de sept semaines souche Sprague Dawley(°) nous sont envoyés régulièrement trois jours avant chaque série d'expérimentations. Leur poids est de 200 à 240 g.

Les animaux sont isolés dans des cages métalliques à lavage automatique Médi-Labo. L'eau est fournie à volonté par l'intermédiaire d'un système d'abreuvoir automatique à valve.

Hors des périodes d'expérimentation, ils reçoivent 25 g d'aliment complet pour rat (°°) sous forme de bouchons contenant 16,8 % de matières azotées totales, 2,7 % de matières grasses et 59,4 % de composés glucidiques.

La distribution a lieu chaque jour à midi, la ration du samedi est doublée.

Une lumière artificielle fluorescente est diffusée de 7 heures à 17 heures. Elle est contrôlée par une horloge.

L'enceinte est thermostatée à 22°C.

La mise à jeûn des rats se fait à 18 heures pour un jeûne de 14 heures ; à 8 heures pour un jeûne de 48 heures ; à 14 heures pour un jeûne de 20 heures. Les animaux sont pesés au début et à la fin de l'essai.

Ils sont décapités à l'aide d'une guillotine entre 8 h 30 et 9 h 30.

(°) Elevage des Oncins - Saint Germain sur l'Arbresle 69210 L'ARBRESLE

(°°) UAR 7 rue du Maréchal Galliéni - Villemoisson sur Orge 91360 EPINAY SUR ORGE
Aliment complet pour rats n°A04

5.2.2. Le sang de rat

Il est prélevé dans un tube contenant une goutte d'héparine à l'aide de pipettes elles-mêmes héparinées.

Il est déprotéinisé dans les deux minutes qui suivent la mort de l'animal.

5.2.3. Le foie de rat

Les méthodes utilisées sont décrites dans la deuxième partie "extraction de la GOT".

5.3. TESTS STATISTIQUES UTILISES

- . Moyenne : $\bar{m}$
- . Ecart-type : s
- . Coefficient de variation : $cv \% \left(\frac{100 s}{\bar{m}} \right)$
- . Précision $\left(\frac{200 s}{\bar{m}} \right)$
- . Distribution gaussienne : test de HENRY
- . Comparaison d'une répartition observée à une répartition théorique : test du Chi-Deux de PEARSON
- . Médiane : valeur obtenue pour 50 % de la population

Coefficient de corrélation : r

$$r = \frac{\text{Covariance (x, y)}}{\sqrt{\text{Variance (x)} \times \text{Variance (y)}}}$$

où x est le résultat de la première méthode
et y le résultat de la seconde méthode

- Comparaison de deux moyennes lorsque la distribution est gaussienne (423)

$$\varepsilon = \frac{\bar{m} \text{ A} - \bar{m} \text{ B}}{\sqrt{\frac{\text{Variance A}^2}{nA} + \frac{\text{Variance B}^2}{nB}}}$$

où $\bar{m} \text{ A}$ et $\bar{m} \text{ B}$ sont les moyennes de deux échantillons A et B.
et $n \text{ A}$ et $n \text{ B}$, la taille des échantillons A et B.

Si $|\varepsilon| < 1,96$, la différence n'est pas significative (à 5 %).

Si $|\varepsilon| \geq 1,96$, la différence est significative et le risque correspondant à ε , lu dans la table de l'écart réduit fixe le degré de signification.

Cette formule n'est utilisable que pour de grands échantillons ($nA \geq 30$, $nB \geq 30$).

- Comparaison de deux échantillons lorsqu'il y a des ex-aequo

- Test de KRUSKAL-WALLIS (257).

D E U X I E M E P A R T I E

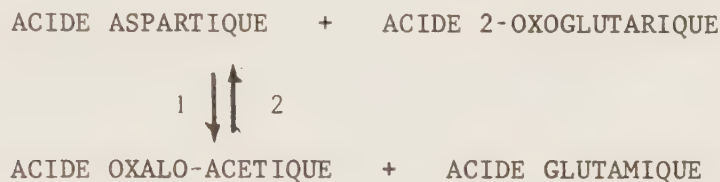
ETUDE DES ISOENZYMES DE LA L-ASPARTATE AMINOTRANSFERASE (E.C.2.6.1.1.)

Nous avons donc décrit les méthodes de séparation et de dosages des substrats (acides aminés, 2 oxo-acides, lactate, glucose, etc...) nécessaires pour aborder l'étude du mécanisme d'action des biguanides. Nous avons précisé également quelques techniques spéciales d'études des mitochondries. En effet, certaines des activités enzymatiques, en particulier la GOT développée à la suite, sont localisées en partie dans ces éléments subcellulaires.

CHAPITRE VI

DONNEES ACTUELLES SUR LES ASPARTATE AMINOTRANSFERASES (GOT)

La L-aspartate aminotransférase ou GOT intervient dans la synthèse et la dégradation de l'acide aspartique et de l'acide glutamique, par l'intermédiaire des 2-oxo acides correspondants, l'acide oxaloacétique et l'acide 2-oxoglutarique.



Les réactions de transaminations sont directement impliquées dans le métabolisme azoté, donc dans l'équilibre protéique de l'organisme.

Les premiers travaux sur l'étude de la GOT sont dûs à BRAUNSTEIN et KRITSMAN en 1937 (57).

Ces auteurs postulaient déjà l'existence de deux enzymes appelées respectivement "aminophérase glutamique et aspartique". Ils proposaient un mécanisme de transamination basé sur la formation d'une base de Schiff par condensation de l'acide amino et du 2-oxo acide, sans libération d'ion ammonium. COHEN (84) quelques années plus tard, niait l'existence de deux enzymes et proposait une seule enzyme, assurant la transamination réversible des couples glutamate-pyruvate et glutamate-oxaloacétate. Il est bien connu actuellement que la GOT et la GPT sont deux enzymes distinctes.

C'est en 1945 que SNELL (439) identifie le coenzyme et démontre la transformation du phosphate de pyridoxal en phosphate de pyridoxamine après fixation de l'acide glutamique.

Par la suite, cette enzyme est devenue un modèle biochimique en enzymologie.

La L-aspartate 2-oxo glutarate aminotransférase (E.C.2.6.1.1.) existe sous des formes moléculaires multiples localisées différemment à l'intérieur de la cellule, dans le cytoplasme et dans les mitochondries. La fonction et les conséquences de cette compartimentation n'ont pas été expliquées jusqu'à présent de façon satisfaisante.

Les propriétés physicochimiques différentes de ces deux isoenzymes permettent leur séparation par électrophorèse et chromatographie liquide sur colonne. Les formes cytoplasmique et mitochondriale portent respectivement le numéro 1 et le numéro 2 d'après la nomenclature internationale (345).

De plus, chaque isoenzyme peut encore être séparée en sous-unités (43, 46, 101, 106, 163, 164, 285, 293, 297, 299, 313, 403, 430, 451, 497). Elles sont parfois appelées α , β .

L'origine de ces formes moléculaires multiples est encore discutée.

Selon MARTINEZ-CARRION, les sous-unités de l'isoenzyme mitochondriale fixeraient des quantités différentes de coenzyme actif (297) ce qui implique des différences "subtiles" au niveau du centre actif dans la liaison avec le coenzyme (285, 313).

D'après ARRIO-DUPONT (19), leur formation est consécutive à une oxydation irréversible des groupements SH pendant l'extraction et la purification des isoenzymes. Cependant MARINO (294) isole des sous-unités à partir de l'isoenzyme cytoplasmique, après un traitement par des concentrations élevées en sulfate d'ammonium et en présence de mercaptoéthanol ou de dithiothréitol.

MARTINEZ-CARRION (313) note en effet, l'apparition progressive des sous-unités pendant la préparation des fractions purifiées. La force ionique du tampon d'extraction pourrait également intervenir (451).

DAVIDSON (101) n'attribue pas l'origine des sous-unités à un artefact pendant la préparation, à une protéolyse, ou même à une désaturation progressive de l'apoenzyme en coenzyme, mais à un contrôle génétique distinct caractérisé par des sous-unités migrant différemment à l'électrophorèse. Il identifie ainsi dans les placentas humains, trois variantes de l'isoenzyme mitochondriale et une variante rare de l'isoenzyme cytoplasmique. Récemment, HACKEL (183) a confirmé ces observations. La première variante de DAVIDSON correspond à la GOT m2-1 de HACKEL, la deuxième variante à la GOT m3-1. HACKEL identifie deux variantes supplémentaires GOT m3 et GOT m3-2.

La forme la plus couramment observée est appelée GOT m1. Elle migre à l'électrophorèse sur gel d'amidon sous forme d'une bande unique. Les autres phénotypes (sauf GOT m3) mitochondriaux, beaucoup plus rares, sont caractérisés par trois bandes migrant différemment. La GOT m3 migre plus loin vers la cathode que la GOT m1 mais ne se dissocie pas en sous-unités.

La GOT m1 et la GOT m3 correspondent à des formes homozygotes. La GOT m2-1 et GOT m3-1 pourraient représenter les formes hétérozygotes.

Ces postulats sont vérifiés, de façon encore incomplète, par les premiers résultats expérimentaux (432). L'étude de HACKEL (183) porte sur plus de 1300 cas et certains phénotypes rares ont déjà été identifiés. Il apparaît en particulier que la forme GOT m2 est plus courante chez les Européens alors que la forme GOT m3 n'a été rencontrée que chez les Noirs Africains. L'existence des sous-unités de la GOT mitochondriale in vivo semble donc réelle.

Dès 1967, MARTINEZ CARRION (298) proposait un contrôle de la GOT II par le DNA mitochondrial et celui de la GOT I par le DNA cytoplasmique.

Les études récentes sur le contrôle génétique des isoenzymes de la GOT complètent nos connaissances sur leur localisation dans l'organisme, leurs propriétés et leur structure. Nous les avons rassemblées dans le sixième chapitre.

6.1. - LOCALISATION

6.1.1. Dans les tissus

La GOT est trouvée dans un grand nombre de tissus : le coeur, le foie, le rein, le muscle, le poumon, le pancréas, l'endomètre, les ovaires, le placenta, le sperme, le cerveau, le liquide céphalo-rachidien, la salive, le plasma, les leucocytes, les érythrocytes, les plaquettes, etc... (101, 155, 169, 207, 245, 285, 355, 410, 475).

Les tissus glycogéniques tels que le coeur, le foie, le rein et le muscle en sont particulièrement riches (231). Le contenu enzymatique varie selon le tissu (512), l'espèce animale (191, 261, 414, 430, 459, 512) et la race (342). Ainsi l'activité transaminasique est maximum dans le foie chez le cheval, dans le coeur chez le rat ; elle est voisine dans le coeur et le foie chez le lapin, le cobaye et le poulet.

Dans un même organe et dans un même tissu, les concentrations en GOT peuvent être différentes. L'activité spécifique est plus élevée dans le lobe gauche du foie (7) et dans les muscles rouges (111, 191). Le gradient de concentration des tissus par rapport au sérum est très élevé .

6.1.2. Dans la cellule

La majeure partie de la GOT (50 à 80 %) est localisée dans les mitochondries (54, 124, 412, 414, 419, 497).

Cette répartition varie selon l'espèce animale (191, 346, 414), la race (342) et la méthode utilisée.

Dans le foie de rat, 60 à 80 % de la GOT (124, 267, 412, 414, 418, 419) sont localisés dans la mitochondrie de la cellule, 20 à 40 % dans le cytoplasme, 2 à 8 % dans la membrane nucléaire et 3 à 7 % dans les microsomes (124, 267, 409).

Chez l'homme (414) le taux de GOT dans le cytoplasme de l'hépatocyte est plus élevé que dans la mitochondrie (61 % et 39 % respectivement).

Selon les travaux de CHAPPELL (72), MARCO (288,289) l'enzyme mitochondriale est située dans la matrice. Cependant, des travaux récents de microscopie électronique avec une révélation spécifique de la GOT intracellulaire, mettent en évidence une répartition régulière de l'enzyme sur la face interne des cristae (266,267). Elle se trouve également entre les membranes interne et externe de la mitochondrie: 2 % sur la membrane externe, 27 % sur la membrane interne et 71 % dans la matrice (289). Ces divergences sur la localisation de la GOT pourraient s'expliquer par des états énergétiques différents des mitochondries, qui seraient fonction de "l'environnement" (374).

6.2. PROPRIETES

La GOT cytoplasmique (I) et la GOT mitochondriale (II) peuvent être séparées par chromatographie et électrophorèse. Elles se distinguent également par leurs propriétés physicochimiques.

Nous insisterons sur les propriétés spécifiques de chacune d'elles lorsqu'elles sont connues.

6.2.1. Poids moléculaire

Le poids moléculaire moyen de la GOT est de $100\ 000 \pm 10\ 000$.

Les différences observées par les auteurs peuvent être expliquées par le degré de purification de l'enzyme et son origine (24, 58, 223, 285, 292, 421).

6.2.2. pH Optimum

L'activité de la GOT est optima entre pH 7,4 et 8 (34, 223, 246, 409, 421, 497).

L'isoenzyme cytoplasmique a une activité de plus en plus faible vers les pH acides. Elle a perdu toute activité à pH 5 alors que la forme mitochondriale conserve encore dans ces conditions 75 % de son activité (246, 409, 497).

6.2.3. Stabilité

La stabilité de l'isoenzyme cytoplasmique à la chaleur est supérieure à celle de l'isoenzyme mitochondriale. Elle n'est pas détruite à 56° ; elle résiste même dix minutes à 65° en présence de 2 oxo glutarate (223).

L'apoenzyme est dénaturée par l'urée 8 M à 60°C. L'enzyme conserve son activité en présence d'urée 8 M à 25°C (78).

La conservation dans les tissus entiers, les homogénats, ou les différentes fractions après ultracentrifugation est bonne (191, 409). Après stockage à -20°, la GOT perd $2,5 \pm 2$ % de son activité originale après deux heures, et moins de $7,3 \pm 1$ % après un an (338).

A température ordinaire, elle perd 1,3 % de son activité (230, 338). MAGEE (285) observe toutefois une altération de l'isoenzyme mitochondriale par stockage à -15° pendant six mois par une modification de la liaison apoenzyme-coenzyme. Dans les mêmes conditions, l'isoenzyme cytoplasmique se dédouble en deux sous-unités.

Dans le sérum, la GOT perd 10 à 15 % de son activité lorsqu'elle est congelée 14 jours à -20° , 15 % après 24 heures à $+4^{\circ}$, 25 % après 48 heures à $+4^{\circ}$ et 10 à 20 % après 24 heures à température ordinaire (34). Cependant, d'autres auteurs n'observent pas de variations pendant le stockage sous forme de sérum ou plasma lyophilisés, congelés ou conservés en chambre froide à $+4^{\circ}$ pendant au moins un mois (10, 120, 188, 200, 230, 450).

6.2.4. Cinétique

Les isoenzymes ont des constantes de dissociation et des affinités différentes pour leurs substrats (201).

La forme cytoplasmique présente une affinité non spécifique pour les acides dicarboxyliques à quatre ou cinq carbones (315), 2 oxo glutarate ou oxaloacétate. Son K_m pour le 2-oxo glutarate est dix fois plus faible que celui de la GOT II (147, 201, 285, 340, 474). Elle est inhibée par un excès de ce 2-oxo acide (474). Le K_m du glutamate pour le couple enzyme-phosphate de pyridoxal est élevé ($K_m = 10 \text{ mM}$) (314).

La GOT mitochondriale a une affinité plus marquée pour les acides à quatre carbones tel que l'acide oxaloacétique. Son K_m pour l'aspartate est 10 fois plus faible que celui de l'isoenzyme I (285, 299, 314, 350, 497).

L'affinité des isoenzymes pour leurs substrats est différente selon l'animal et le tissu.

L'isoenzyme mitochondriale a un K_m de 0,40 mM dans le foie de boeuf, de 0,84 mM dans le coeur humain et 1,0 mM dans le foie humain (55, 121, 201, 340).

Le K_m des deux isoenzymes est lié d'autre part (11, 55, 152) à la température et à la composition ionique du milieu.

L'affinité des isoenzymes pour les acides aminés et les acides dicarboxyliques est dépendante de la concentration en anions du tampon utilisé (55). CHENG, MICHUDA, KOZAK, MARTINEZ-CARRION (75) ont précisé récemment l'effet des ions sur l'activité enzymatique.

- . Aux pH physiologiques faiblement alcalins, les constantes de dissociation du substrat sont proportionnelles à la quantité d'anions présents. Elles sont différentes pour chaque isoenzyme (20, 75).
- . Aux pH acides, la liaison enzyme-substrat provoque le déplacement de plus d'un anion (75).

- . Les tampons affectent le pK de la liaison enzyme-coenzyme. Le pK est déplacé vers les pH alcalins. L'affinité de l'enzyme pour son coenzyme est augmentée (75).
- . Les anions ont une affinité plus grande pour le phosphate de pyridoxamine (75). CHURCHICH (77) rapporte également que la liaison phosphate de pyridoxamine à la protéine enzymatique est
 - stable à pH neutre
 - insensible aux variations en ions NaCl du milieu
 - moins forte en présence de phosphate monopotassique

Les anions modifient l'affinité du phosphate de pyridoxal pour les acides aminés et celle de la pyridoxamine pour les 2-oxo acides, selon leur concentration dans le tampon (75).

D'autres auteurs ont observé cet effet des ions sans en préciser la nature (55, 225, 285, 341).

Certains (39, 55, 338) constatent parfois une activation de la GOT, en particulier l'isoenzyme I par les ions phosphates jusqu'à une concentration finale de 167 mM dans le milieu réactionnel (341).

En fait, cette activation dépend de la concentration en 2-oxo glutarate dans le milieu. Lorsqu'elle est très faible (de l'ordre de 0,167 à 0,67 mM), les ions phosphate inhibent de façon compétitive les deux isoenzymes (341). La mesure enzymatique doit donc se faire avec un large excès de ce substrat (75, 341).

Le délai observé dans le développement de la cinétique enzymatique après le temps zéro de l'addition de substrat pourrait être dû à une interférence des ions (338).

En résumé, quels que soient le milieu biologique analysé et les manipulations effectuées, la composition des ions du milieu réactionnel final doit rester identique pour éviter des erreurs d'interprétation dues à des conditions analytiques variables.

D'autre part, il est nécessaire de faire les mesures à pH 7,4 avec un excès de substrat et à une température rigoureusement constante pour apprécier l'activité totale de l'enzyme.

6.2.5. Inhibiteurs

Les métaux lourds, tels que Ag^+ inhibent l'aspartate amino transférase (116).

Elle est inhibée également par des composés analogues aux substrats ou au coenzyme, le plus souvent par compétition pour le site actif.

Ainsi la cyclosérine et ses dérivés dont la structure spatiale est proche de celle des amino acides, le difluoro-oxaloacétate (37, 258), et l'aminooxyacétate (381) bloquent la réaction de transamination (58).

- L'isoenzyme mitochondriale est sensible à un excès d'aspartate (285). Elle est inhibée par l'acide succinique et maléique, acides dicarboxyliques à 4 carbones, par compétition avec l'acide aspartique pour le phosphate de pyridoxal (315).

La transamination du glutamate par les deux isoenzymes est inhibée par un excès d'oxaloacétate et de 3-phosphoglycéraldéhyde (246, 285, 315, 343).

- L'isoenzyme cytoplasmique est inhibée par un excès de 2-oxo-glutarate, de façon non compétitive (55, 223, 285, 474) alors que d'autres acides dicarboxyliques à 4 ou 5 carbones tels que l'acide succinique, maléique, glutarique et adipique entrent en compétition avec l'acide amino pour les deux formes de coenzyme (315).

- Les anions agissent comme des inhibiteurs compétitifs des substrats pour le centre du site actif des isoenzymes, chargé positivement à l'endroit où se lient les substrats carboxyliques (75, 225, 341).

La GOT est inhibée par ordre décroissant (75) par : le benzoate, les chlorures, l'acétate, le phosphate, le cacodylate. Ces composés entrent également en compétition avec les deux formes du coenzyme : phosphate de pyridoxal et phosphate de pyridoxamine (75). Cette compétition est d'ailleurs plus marquée pour l'isoenzyme mitochondriale (75).

L'inhibition par les ions sulfate est différente selon le milieu (341). Dans un tampon phosphate-TRIS, l'enzyme II est inhibée dans des proportions de 7 à 12 % en présence de sulfate d'ammonium. Elle n'est que de 1 à 8 % pour l'isoenzyme I. La GOT est également inhibée par les ions NH_4^+ , Na^+ , K^+ . Dans le tampon TRIS seul, la GOT II est inhibée par les ions phosphate et sulfate.

L'inhibition est levée par les ions Cl^- (77, 341).

- Les dérivés homologues du phosphate de pyridoxal (pyridoxal, phosphate de pyridoxol, ortho phosphate, hydrazine nicotinique) empêchent la fixation du coenzyme sur l'apoenzyme (421)

L'hydroxylamine n'inhibe l'enzyme que sous sa forme aldéhydique. Cette inhibition se produit par interaction du radical NH_2OH et du pyridoxal qui forment une base de Schiff (116).

STEIN (449) observe une inhibition des deux isoenzymes de la GOT par l'hydrazine. Elle est levée in vitro par un excès de coenzyme. Par contre l'administration de vitamine B_6 in vivo ne lève pas l'inhibition.

L'activité des isoenzymes de la GOT est donc, non seulement fonction de la concentration en substrats, mais aussi de la composition ionique du milieu.

6.2.6. Spécificité

L'enzyme peut se lier à des analogues structuraux de ses substrats, tels que l'acide cystéique, homocystéique, la cystéine (224), l'acide érythro DL bêta hydroxyaspartique, alpha méthylaspartique, la L.sérine-o-sulfate, la L.méthionine, la L.sérine, la L-arginine, la L-phénylalanine (76, 129, 130, 152) l'acide succinique, l'acide glutarique, l'acide adipique (223).

La transamination se fait essentiellement avec le couple aspartate-2-oxo glutarate ; pourtant la GOT II du rein de boeuf se lie également au glutamate-phénylpyruvate et glutamate-hydroxyphényl pyruvate (162).

Ces travaux ont été repris par SHRAWDER et MARTINEZ-CARRION (435). Ces auteurs ont montré que la phénylalanine transaminase du cerveau et l'aspartate aminotransférase sont une même enzyme. La synthèse de phénylpyruvate est plus importante dans la mitochondrie ce qui suppose une participation plus importante de l'isoenzyme mitochondriale de la GOT pour la transamination de la phénylalanine.

Le coenzyme est très spécifique de l'apoenzyme (162).

6.2.7. Immunologie

Le pouvoir antigénique est propre à chaque isoenzyme et on n'observe pas de réaction croisée quels que soient les animaux ou les tissus étudiés (261, 285, 299, 340, 342, 497).

Le site antigénique est différent du site actif et le complexe antigène-anticorps conserve son activité.

6.3. - STRUCTURE ET MECANISME D'ACTION

L'aspartate aminotransférase est de structure dimérique. Les poids moléculaires de chaque monomère sont identiques. Chacun d'eux est terminé par une molécule d'alanine N terminale. L'autre extrémité de la chaîne est constituée par une molécule d'acide glutamique C terminal (58, 291, 298).

La GOT cytoplasmique comprend 400 à 430 résidus d'acides aminés (24, 229, 297, 298, 300, 352).

La composition en acides aminés des deux isoenzymes est différente (39, 298, 313) alors que celle des sous-unités est identique à l'isoenzyme d'origine (39, 285, 297, 298, 433).

La séquence en est partiellement connue (352). La carte peptidique de l'apoenzyme décrite par BRAUNSTEIN (352) comprend une chaîne peptidique appelée Ch 5, identifiée au site actif de l'enzyme.

La structure secondaire fait encore l'objet de discussions. Selon BERTLAND (39) la GOT II aurait une structure α , et la GOT I une structure β .

Selon MARTINEZ-CARRION (302) d'autre part, 40 % de la structure des deux isoenzymes seraient de type α . La structure β serait présente dans des proportions minimes.

Le coenzyme est lié à l'apoenzyme par une liaison aldimine au groupe ϵ d'un résidu lysine de l'apoprotéine. Deux molécules de coenzyme sont fixées à une molécule de protéine (24, 58, 223, 291, 298, 403).

Il apparait deux centres distincts dans le site actif, selon sa configuration spatiale et sa fonction (352)

- le premier assure la liaison du phosphate de pyridoxal sous forme de base de Schiff avec la lysine.
- le deuxième site est lié au substrat et aux groupes catalytiques qui participent au réarrangement des protons du couple coenzyme-substrat (58, 298).
Au pH optimum de la réaction de transamination, les substrats sont ionisés (58).

La conformation du site actif serait identique pour les deux isoenzymes (302).

Les isoenzymes de la GOT et leurs sous-unités ont donc une structure très proche.

L'activité de l'enzyme nécessite :

1. Une liaison ionique entre le phosphate de pyridoxal et le site actif. La liaison se fait par l'intermédiaire d'un groupe cationique (H^+) de la protéine.

L'activité de la GOT est associée à des changements séquentiels de l'orientation du coenzyme (58).

2. Un pont hydrogène entre l'azote du cycle pyridine du coenzyme et un donneur de protons de l'apoenzyme (58, 433).
3. Une liaison entre le groupe phénol du phosphate de pyridoxal et l'atome iminé de la lysine. Le groupe phénol est essentiel pour l'action enzymatique et la catalyse par le phosphate de pyridoxal. Le groupe phosphate confère une affinité mille fois supérieure au pyridoxal.
4. Un radical méthyl en position 2 dans la structure du coenzyme. Il assure la liaison avec une zone hydrophobe de l'apoenzyme.
5. Deux résidus histidine (58, 63, 301) et un résidu imidazole (58) sont nécessaires dans la structure de chaque monomère. L'histidine serait un accepteur de protons et catalyserait le transfert d'un proton (H^+) du substrat aminé après la formation du complexe E - S (300,364).
6. Des radicaux SH qui jouent un rôle prépondérant dans la configuration spatiale de la protéine (58), COURNIL (91) fait une distinction entre la forme liée au 5' phosphate de pyridoxal et la forme liée au phosphate de pyridoxamine.

Dans le premier cas, les liaisons SH n'ont aucune influence ni sur la conformation de l'enzyme, ni sur son activité (448).

Dans l'autre, deux groupes SH du site actif deviennent accessibles et un blocage entraîne une perte d'activité.

L'importance des fonctions SH est différente selon les isoenzymes. Elles ne sont pas essentielles pour l'activité catalytique de la GOT II. Un blocage des radicaux SH de l'isoenzyme cytoplasmique liée à la pyridoxamine entraîne une dissociation plus lente par rapport à l'isoenzyme mitochondriale.

Il est possible que la sensibilité de la GOT I soit due à la position des groupes SH, proches du centre actif (448).

7. Un noyau tyrosine dans le site actif. Il est indispensable pour l'activité de l'enzyme car il participe à la liaison du phosphate de pyridoxal (58, 76, 433).

Voici donc rapidement résumées les données actuelles sur les différentes formes de la GOT et le mécanisme de transamination. Remarquons en particulier les sensibilités différentes des deux formes moléculaires aux acides en C_4 et C_5 .

Nos connaissances sur la localisation tissulaire et intracellulaire de la GOT, sur sa structure et ses régulations, ne sont encore que fragmentaires.

Nous présenterons dans les chapitres suivants, après les méthodes de mesure, les techniques mises en oeuvre pour l'étude de la GOT et les résultats obtenus chez l'homme et l'animal.

CHAPITRE VII

METHODES DE MESURE DE L'ACTIVITE DE LA L-ASPARTATE AMINO TRANSFERASE

Après un rappel des méthodes de dosage existantes, nous décrirons les techniques retenues et les résultats comparatifs obtenus avec le plasma, le sérum, les érythrocytes et les tissus.

7.1. METHODES EXISTANTES

7.1.1. Estimation manométrique de l'oxaloacétate

Le CO_2 libéré après décarboxylation de l'acide oxaloacétique est mesuré selon la méthode de WARBURG (349). Cette méthode est abandonnée actuellement.

7.1.2. Méthodes spectrophotométriques7.1.2.1. Dosage spectrophotométrique direct de l'oxaloacétate

L'oxaloacétate formé au cours de la réaction de transamination est mesuré directement à 280 nm (175, 337, 338). Cette méthode est limitée par l'accumulation de l'oxaloacétate. Celui-ci s'énolise rapidement et inhibe la réaction de transamination.

7.1.2.2. Etude de la cinétique de la réaction enzymatique7.1.2.2.1. Méthode de KARMEN (32, 34, 234, 259, 322)

L'oxaloacétate formé au cours de la réaction de transamination est couplé avec une seconde réaction enzymatique, utilisant la MDH dont le coenzyme est le NADH. L'oxaloacétate est transformé en malate alors que le NADH est oxydé en NAD. La diminution de l'absorption du NADH est mesurée à 340 nm. La cinétique de la réaction enzymatique est suivie en fonction du temps. Une unité KARMEN correspond à la diminution des densités optiques de 0,001 pendant une minute par millilitre de sérum et à température ambiante.

Elle est remplacée à l'heure actuelle par l'unité internationale correspondant au nombre de micromoles de NADH^+ transformées par minute et par litre.

7.1.2.2.2. Méthodes de KARMEN modifiées

De nombreuses variations ont été apportées à la méthode originale de KARMEN, portant sur les concentrations en substrats, les temps et températures d'incubation (7, 200, 259, 420, 504).

La présence de LDH pendant l'incubation améliore la spécificité de la méthode. Le pyruvate est transformé en lactate. Une partie du NADH est alors oxydée en NAD avant le dosage de l'activité enzymatique de l'aspartate aminotransférase. Les concentrations très faibles de pyruvate dans le sérum modifient peu les concentrations initiales de NADH dans le milieu réactionnel.

La méthode de BERGMAYER H.U. et BERNT E. (34) est la seule utilisant les conditions expérimentales optimales. Entre pH 6 et 8,5, l'activité enzymatique dépend de la concentration de l'aspartate dans le milieu alors qu'elle est pratiquement indépendante de celle de l'oxoglutarate. L'activité optimale apparaît entre pH 7 et 8,5 pour des concentrations en aspartate supérieures à 200 mM et à 25°. Plus précisément, en présence d'une solution tampon phosphate pH 7,6 et de 6 à 10 mM de 2 oxo-glutarate, les concentrations en aspartate se situent entre 200 et 500 mM.

Les valeurs sont plus élevées lorsque les concentrations en substrats sont optimum. La corrélation entre les différentes méthodes est bonne (17, 230). La méthode de HENRY (199) donne des résultats identiques à 37° à la méthode "optimum". Les températures utilisées s'échelonnent entre 25 et 37°.

Utilisée surtout en méthode manuelle et semi-automatique, elle est adaptée en technique automatique en flux continu (161, 191).

La cinétique présente un délai de quelques secondes après l'addition de 2-oxo glutarate. Elle serait due :

- à une combinaison de l'enzyme avec des protéines (338)
- à une compétition entre les substrats (223, 338)
- à l'influence des ions (39, 55, 75, 201, 225, 285, 341).

Causes d'erreurs

La présence de déshydrogénase glutamique interfère dans le dosage car elle catalyse la réduction du 2-oxo glutarate en oxydant simultanément le NADH. Cette enzyme est inhibée par les ions NH_4^+ de la solution de MDH et de LDH. Néanmoins, dans le cas où son activité est augmentée, la majeure partie du NADH peut être consommée avant l'addition du 2-oxo glutarate.

La réaction enzymatique ne se déroule donc plus dans les conditions optimales.

Il est donc utile dans ces cas, de faire une correction à l'aide d'un témoin dans lequel la réaction transaminasique sera déclenchée par addition de L(+) aspartate.

La pureté des solutions de MDH et LDH est un critère fondamental de la spécificité de la méthode. La MDH ne doit pas contenir plus de 0,01 % de GOT et 0,03 % de glutamate déshydrogénase. La MDH doit être dépourvue de toute trace d'apoenzyme de l'aspartate aminotransférase. La conservation des enzymes dans les solutions de sulfate d'ammonium diminue les risques d'erreurs dues à une contamination des réactifs par la glutamate déshydrogénase.

7.1.3. Méthodes fluorimétriques

Le NADH présente un pic d'excitation à 340 nm et un pic d'émission à 470 nm, contrairement au NAD.

L'activité enzymatique dans ce cas est proportionnelle à la diminution de la fluorescence (60). Cette technique a été adaptée en méthode automatique par LEVINE et HILL (270), SCHWARTZ et BODANSKY (426).

La dialyse permet l'élimination des systèmes enzymatiques endogènes, capables d'oxyder le NADH. L'oxaloacétate est recueilli dans le flux de contre-dialyse contenant la MDH et le NADH. Le blanc-sérum peut être ainsi évité. La concentration en NADH détermine l'amplitude de la gamme.

Cette méthode tend à donner des résultats plus élevés que la méthode cinétique manuelle aussi bien dans la zone des valeurs usuelles que dans celle des valeurs pathologiques, mais la stabilité et la reproductibilité des résultats sont satisfaisantes.

Elle est adaptée en microméthode.

7.1.4. Méthodes colorimétriques

Les produits de la réaction enzymatique, glutamate ou oxaloacétate sont révélés directement par un colorant spécifique ou couplés avec une seconde enzyme de révélation. Le premier groupe comprend les réactifs de coloration de l'oxaloacétate, la 2-4 dinitrophénylhydrazine (2.4.DNPH) et les sels de diazonium.

7.1.4.1. Dosages de l'oxaloacétate par la 2.4. DNPH

La méthode initiale est due à REITMAN et FRANKEL (375). La 2.4.DNPH réagit avec l'oxaloacétate décarboxylé en pyruvate pour former une hydrazone dont le maximum d'absorption se situe à 505 nm en milieu alcalin.

Cette méthode a été souvent critiquée pour de multiples raisons :

- . les concentrations en substrats ne sont pas optimales.
- . la 2.4.DNPH manque de spécificité. Elle réagit également avec le substrat, le 2 oxo-glutarate présent en excès dont l'hydrazone, a une absorption minima à 505 nm. Celle-ci entraîne cependant des erreurs importantes dues au témoin lorsque l'activité enzymatique est faible.
- . l'oxaloacétate accumulé est instable. Il inhibe également la réaction à des concentrations élevées (200).
- . la 2.4DNPH réagit aussi avec les aldéhydes et les corps cétoniques. L'erreur par excès est fonction de l'augmentation de ces composés au cours de maladies métaboliques telles que la phénylcétonurie ou la leucinose, et au cours du diabète.
- . GIUSTI (171) a montré une décarboxylation partielle de l'oxaloacétate en pyruvate.
- . une correspondance arbitraire est établie avec la méthode spectrophotométrique de KARMEN alors que la corrélation entre les deux méthodes n'est pas linéaire (8, 200).
- . cette méthode peu sensible, peut être utilisée lorsque les activités sont proches des valeurs normales.

Modification de la méthode de REITMAN et FRANKEL

Les modifications portent sur les variations de concentration en substrat pour atteindre les conditions optimales. La droite d'étalonnage est établie avec de l'oxaloacétate (239) ou un sérum standard.

La décarboxylation de l'oxaloacétate est rendue plus complète en présence de citrate d'aniline (15, 34, 65, 113, 469). La spécificité de la méthode est améliorée par une extraction par le toluène (113, 469).

La méthode de REITMAN et FRANKEL a été automatisée par FINGERHUT (140) puis par AXELSSON, MASAMITSU, MAXFIELD, SCHAFFERT (21, 22, 23, 406).

VAN DEN BOSCHE et VAN BELLE (472) ont adopté la technique utilisant la décarboxylation de l'oxaloacétate par le citrate d'aniline. Elle présente l'avantage d'utiliser des volumes d'échantillon plus petits.

7.1.4.2. Dosage de l'oxaloacétate par un sel de diazonium

L'azoène Fast Violet B de BABSON (22,23) donnant des blancs de valeur élevée (34, 333, 356), a été avantageusement remplacé par l'azoène Fast Red PDC ou Fast Ponceau L, sel de diazonium du N butyl 4 méthoxymétanilamide (325, 326, 327, 401, 402, 406). Ce colorant est uniquement utilisé dans les techniques automatiques de dosage de l'aspartate aminotransférase adaptées par SCHAFFERT (406) puis par MORGENSTERN (326, 327).

Ces deux derniers auteurs éliminent la nécessité d'un blanc en dialysant l'oxaloacétate avant la réaction colorée. Cependant, cette suppression est critiquée par SAX et MOORE (325, 401) et CHEN (74). Les résultats sont plus élevés dans les cas pathologiques par rapport à une méthode spectrophotométrique de référence. Cette élévation serait due en particulier à la présence d'acéto-acétate, urée, glucose, bilirubine, dialysables, formant des complexes colorés avec l'azoène Fast Red. Certains médicaments comme le P.A.S.(173) interfèrent également dans le dosage. La stabilité du colorant est meilleure dans un tampon lactate (9) que dans un tampon citrate (325, 326, 327).

L'azoène Fast Violet B ou sel de diazonium de la 6 benzamido 4 méthoxy m-toluidine est repris dernièrement par DOUMAS et BIGGS (112) utilisant une solution colorante vingt fois moins concentrée que celle utilisée par BABSON donc un blanc de valeur moins élevée. Mais les variations faibles de pH, l'acide acéto-acétique, la bilirubine, interfèrent également dans le dosage.

Un nouveau colorant est proposé par LOMBARTS (275), le Fast Red Salt KL. Sa spécificité n'est pas supérieure à celle de l'azoène Fast Red.

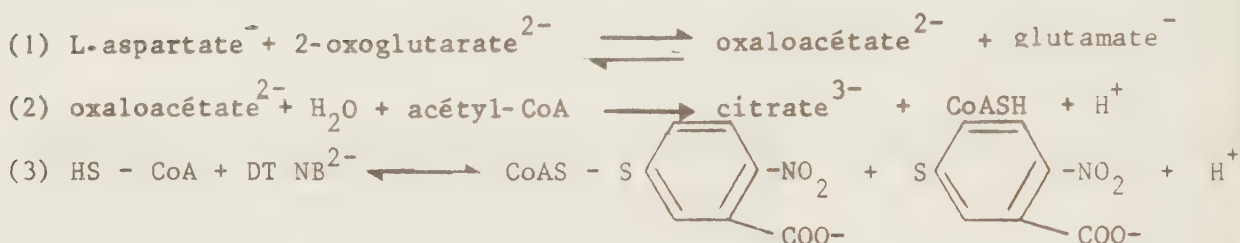
7.1.4.3. Dosage de l'oxaloacétate par la vanilline

Après décarboxylation par chauffage à 60°, l'acide pyruvique formé est couplé à la vanilline selon la méthode de TRINDER et KIRKLAND (467, 468).

7.1.4.4. Dosage de l'oxaloacétate par couplage avec l'acétyl Coenzyme A

La forme réduite du coenzyme A est révélée par un colorant spécifique selon la méthode de ITOH et SRERE (219,220).

Le principe repose sur la suite de réactions suivantes :



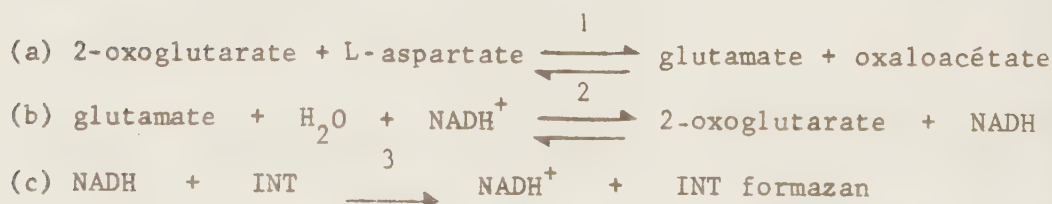
La réaction (1) est catalysée par l'aspartate amino-transférase, la réaction (2) par la citrate synthétase (E.C.4.1.3.7.).

Le CoA réduit forme un complexe coloré (réaction 3) avec l'acide 2-nitro-5-thiobenzoïque.

7.1.4.5. Dosage du glutamate formé par couplage avec la déshydrogénase glutamique

et révélation du passage du NAD réduit en NAD par un sel de tétrazolium en présence de PMS selon la méthode de LIPPI et GUIDI (271).

Le principe en est le suivant :



1 : L.aspartate 2 oxoglutarate aminotransférase (E.C.2.6.1.1.)

2 : L.glutamate : NAD oxydo réductase (E.C.1.4.1.2.)

3 : PMS ou N méthylphénazonium méthosulfate

INT : Chlorure de 2-p.iodophényl-3-nitrophényl-5-phényltétrazolium

Le temps d'incubation à 37° est très long : 45 minutes.

7.2. ETUDE TECHNIQUE COMPARATIVE

Nous avons effectué des essais comparatifs des techniques de dosage de la GOT sur les appareils présents au laboratoire, selon :

- . le nombre de mesures
- . la précision des résultats
- . la souplesse d'utilisation du matériel

Nous utilisons un ensemble en flux continu et quatre ensembles reposant sur des méthodes cinétiques :

- . SMA 12/60 Technicon
- . Deux ensembles de microméthodes Eppendorf équipés d'un photomètre 1100 M à passeur automatique
- . Reaction Rate Analyzer LKB 8600
- . Automate Eppendorf 5010

Les valeurs sont lues sur les enregistrements graphiques. Les valeurs des angles correspondant aux pentes des réactions cinétiques sont transcrites sur des feuilles de code carte et traitées par ordinateur (ICI 1901 A) ou Programma Olivetti.

La GOT est dosée par la méthode colorimétrique de MORGENSTERN (326, 327) sur SMA 12/60 Technicon et par une méthode cinétique sur tous les appareils semi-automatiques, à l'aide de coffrets réactifs prêts à l'emploi Boehringer. Nous utilisons les coffrets "optimisés" (n° 15923 TGAT) sur les appareils LKB 8600 et Automate 5010.

La température à laquelle a été effectuée la mesure est précisée pour chaque série de résultats.

7.2.1. Réactifs

Les comparaisons d'appareils sont peu aisées. En effet, les réactifs préconisés par les constructeurs posent souvent des problèmes. Les concentrations en substrats en particulier sont différentes d'un appareil à un autre.

Nous avons établi un tableau comparatif des concentrations en substrats, selon les appareils, rapportées au millilitre de plasma. (tableau 8).

TABEAU VIII : REACTIFS : CONCENTRATIONS EN SUBSTRATS
(exprimées en $\mu\text{M/ml}$ de plasma)

	MICROMETHODE EPPENDORF	LKB 8600	AUTOMATE 5010 EPPENDORF
Aspartate	160	200	198
NADH	1,20	1,37	1,36
2 oxo glutarate	50,0	41,9	41,5

Pour le LKB 8600 et l'Automate 5010, les concentrations finales sont très voisines car les coffrets-réactifs préconisés par les fabricants sont identiques (tableau 8). Les différences minimales sont dues au fait que ces appareils ne délivrent pas des quantités identiques. En effet, le premier travaille sur un ml de volume final et le second sur 0,5 ml.

Une uniformisation encore plus grande des réactifs est indispensable.

7.2.2. Méthodes

Le choix entre les méthodes en flux continu et les méthodes cinétiques automatiques repose d'abord sur le choix entre méthode colorimétrique et cinétique. Les enzymologistes donnent la préférence aux méthodes cinétiques. Cependant les avantages de celles-ci par rapport aux méthodes colorimétriques ne sont pas primordiaux. Nous ne retiendrons que deux avantages qui, à notre avis, font cependant pencher la balance en faveur des mesures cinétiques :

- . Les temps d'incubation plus courts
- . La vérification du bon déroulement de la cinétique au moyen d'un enregistrement.

Par contre, entre les deux types de méthodes automatiques, le problème est un peu différent.

Les méthodes en flux continu reposent à l'heure actuelle, sur la mesure en un point du produit de la réaction après incubation et dialyse. Les principaux inconvénients de ces méthodes sont les contaminations et la dérive qui expliquent la mauvaise corrélation ($r = 0,7$) entre la méthode colorimétrique en flux continu et la méthode cinétique automatisée. Elles restent valables chaque fois que des méthodes colorimétriques ou fluorimétriques sont seules possibles ou sont beaucoup plus simples.

Les méthodes cinétiques automatisées ne diffèrent que peu des mesures cinétiques manuelles en dehors du matériel spécial qu'elles nécessitent et non utilisable à d'autres fins. (figure 12). On peut cependant insister à nouveau sur une plus grande uniformisation des techniques, avec ce type de méthodes.

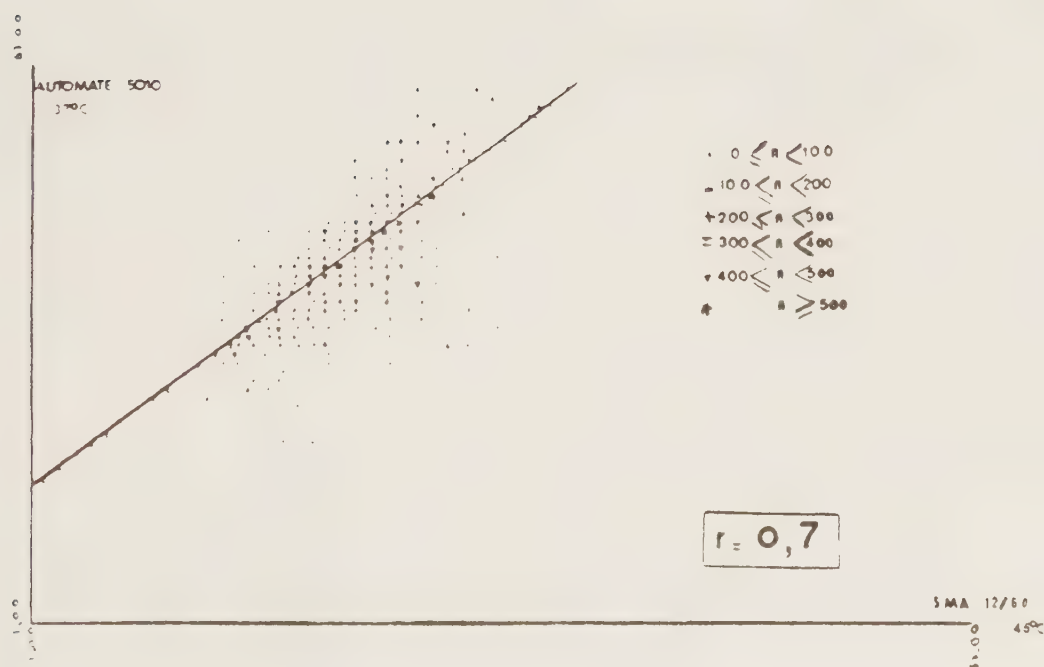


Figure 12 : Comparaison des méthodes cinétiques et colorimétriques automatisées.

7.2.3. Température

La standardisation des méthodes enzymatiques à l'échelle internationale devrait également concerner la température d'incubation. En Allemagne, la température de 25° est généralisée alors que dans les autres pays l'échelle des températures s'étend de 25° à 37° rendant plus difficiles les études comparatives inter-laboratoires.

Dans notre laboratoire, le choix est en partie conditionné par l'appareillage :

- . 25° et 37° sur l'ensemble microanalytique Eppendorf
- . 30° et 37° sur le LKB 8600
- . 45° sur le SMA 12/60 Technicon pour le dosage de la GOT
- . 25° et 37° sur l'Automate 5010

A 37°

- 1. Les cinétiques sont plus rapides. Le temps d'incubation nécessaire au bon déroulement de la réaction est raccourci et il n'y a pas alors de dénaturation. De plus les temps d'incubation étant plus courts, le débit des appareils peut être augmenté, ce qui n'est pas négligeable.
- 2. La stabilité de la température dans l'enceinte de mesure des appareils est meilleure. Cette remarque est particulièrement justifiée dans le cas du LKB 8600 puisque une mesure à 25° s'avère impossible.
- 3. 37° est la température physiologique. C'est l'une des raisons pour laquelle KING (240) préconise cette température pour les dosages en enzymologie.
- 4. La précision est plus grande dans la zone des valeurs usuelles.

7.2.4. Débit

L'évaluation des débits de chaque appareil doit tenir compte de l'ensemble du dosage, depuis la préparation du matériel et des réactifs jusqu'à la lecture des enregistrements, et non pas du seul débit basé sur les temps d'enregistrement.

Le tableau 9 établit une comparaison des cadences réelles des appareils étudiés.

TABLEAU IX : CADENCE D'ANALYSE SELON LES APPAREILS
GOT (et GPT si deuxième canal)

	MICRO METHODE EPPENDORF	LKB 8600	CHAINE SIMPLE TECHNICON	SMA 12/60 TECHNICON		AUTOMATE 5010 EPPENDORF	
				1 CANAL	2e CANAL	MONOCANAL	BICANAL
MISE EN ROUTE DE L'APPAREIL (en mn)	35	45	75	90	90	50	85
CADENCE REELLE DES ANALYSES/HEURE	36	50	60	60	120	60	120
LECTURE D'UN ENRE- GISTREMENT ET CALCUL en mU/ml (en sec)	30	10	20	10	15	10	10
TEMPS REEL POUR 100 ANALYSES (en mn)	251	181	208	208	152	168	151
TEMPS REEL POUR 200 ANALYSES (en mn)	467	317	341	326	214	286	217

. Mise en route de l'appareil

Le temps de mise en route de l'appareil comprend la préparation des réactifs, des séries d'échantillons et la durée de la pré-incubation.

Les appareils à flux continu Technicon ainsi que l'Automate 5010 présentent dans ce cas l'avantage d'une automatisation complète de l'analyse bien que le temps de mise en route de l'appareil lui-même soit plus long.

. Cadence réelle des analyses par heure

Ce cadence représente le nombre de mesures enregistrées pendant une heure. Il est essentiellement fonction de la capacité des dosages en simultané de chaque appareil et du temps de mesure de la cinétique ou de la réaction colorée.

Les chaînes multicanaux ont donc une cadence des analyses par heure plus importante qui est fonction

- du nombre de canaux fonctionnels, un pour le LKB 8600, bien qu'il soit équipé de deux canaux, deux au maximum pour l'Automate 5010, douze pour le SMA 12/60.
- de la rapidité de la mesure (à un point sur les appareils à flux continu, ou à plusieurs points en discontinu sur le matériel Eppendorf).

. Lecture d'un enregistrement et calcul

Le dépouillement des enregistrements et le calcul en mU/ml étant manuels pour la plupart des appareils, sauf pour le SMA 12/60, le gain de temps constaté à l'emploi d'un calculateur couplé au LKB 8600 n'est pas suffisant pour justifier pour nous son achat, sauf s'il était relié directement à une perforatrice.

. Temps réel pour 100 puis 200 analyses

La mise en route des appareils intervient nettement dans le temps de mesure des cent premiers échantillons.

Par contre les possibilités réelles d'un appareillage entièrement automatique et fonctionnant en simultané sont plus nettement mises en évidence au cours des cent analyses suivantes.

Il ne convient cependant qu'aux grandes séries car la durée de sa mise en route est très longue.

7.2.5. Reproductibilité

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 10. Avec des réserves dues aux différences de température et de réactifs, la reproductibilité est moins bonne sur l'ensemble microanalytique Eppendorf que sur l'Automate 5010. Comme on pouvait s'y attendre, l'automatisation améliore donc la reproductibilité.

Cependant la reproductibilité des mesures sur LKB 8600 semi-automatique atteint celle du SMA 12/60 et de l'Automate 5010. Elle est comparable à celle obtenue par GROTSCH (180).

Cette performance s'explique par deux arguments techniques :

- . le système de compensation très rapide
- . et l'enregistrement en continu de la cinétique

Dans la zone des valeurs usuelles d'autre part, la reproductibilité journalière des deux automates : SMA 12/60 et Automate 5010, est en faveur de ce dernier.

TABLEAU X : COMPARAISON des COEFFICIENTS de VARIATION OBTENUS SUR QUATRES APPAREILS.

	nombre d'essais	$\bar{m}$	s	Coeff. de variation $\left(\frac{s}{\bar{m}} \times 100\right)$	Précision $\frac{2s}{\bar{m}} \times 100$
MICROMETHODE EPPENDORF 1100 M (25° C)	29	9,56	0,85	8,88	17,76
	30	9,0	0,7	7,77	15,54
	29	9,83	0,77	7,83	15,66
	29	10,70	0,45	4,20	8,40
	29	9,20	0,55	5,98	11,96
L.K.B. 8600 (30° C)	29	9,77	0,25	2,59	5,18
	29	9,15	0,27	2,95	5,90
	29	9,78	0,46	4,70	9,40
	29	10,68	0,38	3,55	7,10
	29	11,81	0,34	2,86	5,72
SMA 12/60 TECHNICON (45° C)	32	33,79	1,40	4,14	8,28
	32	33,28	0,84	2,52	5,04
	32	38,62	2,64	6,83	13,66
	30	36,80	1,58	4,29	8,58
	32	29,42	1,32	4,50	9,00
AUTOMATE 5010 EPPENDORF (25° C)	29	8,12	0,31	3,81	7,62
	29	8,79	0,51	5,80	11,60
	29	9,53	0,71	7,45	14,90
	29	8,94	0,62	6,93	13,86
	29	8,31	0,42	5,05	10,10
AUTOMATE 5010 EPPENDORF (37° C)	30	23,65	0,51	2,16	4,32
	30	21,53	0,49	2,28	4,56
	30	25,78	0,67	2,63	5,26

7.3. DOSAGE DANS LE PLASMA HUMAIN

En général, les dosages sont faits indifféremment sur sérum ou sur plasma. Dans ce dernier cas, l'anticoagulant peut être de l'oxaloacétate, du citrate, de l'EDTA ou de l'héparine (34, 160, 200, 401, 503). L'emploi de fluorure de sodium est déconseillé car les valeurs obtenues sont plus fortes (401).

7.3.1. Choix entre sérum et plasma

Des essais comparatifs de mesures de l'activité de la GOT dans le sérum et le plasma de mêmes sujets n'ont pas montré de différences significatives (tableau 11). Nous avons cependant préféré travailler sur plasma pour pouvoir séparer rapidement les éléments figurés du sang.

TABLEAU XI : ETUDE DES VALEURS DE LA GOT SUR SERUM ET PLASMA.
MESURE EFFECTUEE SUR LES MEMES SUJETS (METHODE DE MORGENSTERN)

n	m sérum	m plasma	s sérum	s plasma	"t"	$\frac{\text{Res.Var \%}}{\text{Y Var}}$	Pente a	Ordonnée f	r
73	31,2	30,8	7,8	7,9	1,03	16,3	0,92	1,9	0,91

7.3.2. Matériel et méthode

Le sang est recueilli sur tube sec ou sur héparinate de lithium entre 8 h et 8 h 30 chez les sujets à jeûn depuis la veille, et entre 13 h et 14 h chez des sujets ayant pris un repas. Le plasma est séparé immédiatement après le prélèvement.

Le dosage est effectué selon la méthode automatique en flux continu sur SMA 12/60 Technicon.

TABEAU XII : CONSERVATION DE LA GOT DANS LE PLASMA A DIFFERENTES TEMPERATURES
PENDANT 48 HEURES (mU/ml).

Température		n	$\bar{m}$		s.		r
Cong. *	Cons. **		t = 0	t = 48 heures	t = 0	t = 48 heures	
- 196 °	- 196 °	108	42,3	40,5	11,45	12,85	0,64
- 196 °	- 196 °	118	36,4	36,8	7,8	9,0	0,80
- 80 °	- 20 °	74	39,5	36,63	9,90	10,18	0,75
- 30 °	- 30 °	95	33,51	33,98	10,56	8,59	0,91
+ 4 °	+ 4 °	88	29,19	29,13	7,53	7,45	0,83
+ 4 °	+ 4 °	35	35,77	34,48	8,70	10,09	0,93
Température ambiante		103	31,90	30,04	8,78	8,07	0,93

* Température de congélation

** Température de conservation.

7.3.3. Conservation des prélèvements

Les résultats relevés dans la bibliographie portent sur un petit nombre d'échantillons. De plus, les conditions d'utilisation du froid ne sont pas précisées.

C'est pourquoi nous nous sommes souciés d'étudier la conservation de la GOT plasmatique sur un échantillon de taille statistique satisfaisante (100 environ).

L'activité enzymatique est mesurée dans le sérum ou le plasma, le jour même du prélèvement selon la méthode de MORGENSTERN (326, 327).

Les températures de conservation choisies sont : -196° , -20° après congélation rapide à -80° , -30° , $+4^{\circ}$, température ambiante ou lyophilisation.

7.3.3.1. Conservation pendant 48 heures

Un échantillon de plasma est prélevé dans les séries quotidiennes, dosé, puis placé dans les conditions fixées pour la conservation. Après 48 heures, les fractions congelées sont placées dans un bain-marie à 37°C pendant 15 minutes puis dosées à nouveau.

La stabilité dépend de la température de conservation. L'activité enzymatique du plasma est stable à température ambiante, $+4^{\circ}$, -30° . Les écarts sont plus grands lorsque la température s'abaisse jusqu'à -196° ou lorsque les échantillons sont congelés rapidement à -80°C puis conservés à -20°C (tableau 12).

7.3.3.2. Conservation de longue durée

Dans ce cas, un pool constitué chaque jour à partir des volumes de sérum excédentaires - (de 30 à 50 sujets) - Cette opération est poursuivie durant trente jours au minimum.

Les pools obtenus sont alors répartis en fractions de 5 ml. L'une des fractions est dosée dans la série quotidienne. Les autres sont conservées afin d'être dosées après 24 heures, 7 jours, 30 jours, 6 mois, 12 mois, 18 mois. La lyophilisation est effectuée sous azote mais les flacons sont bouchés de façon manuelle. D'autre part, la remise en solution dans 5 ml, entraîne une dilution systématique connue.

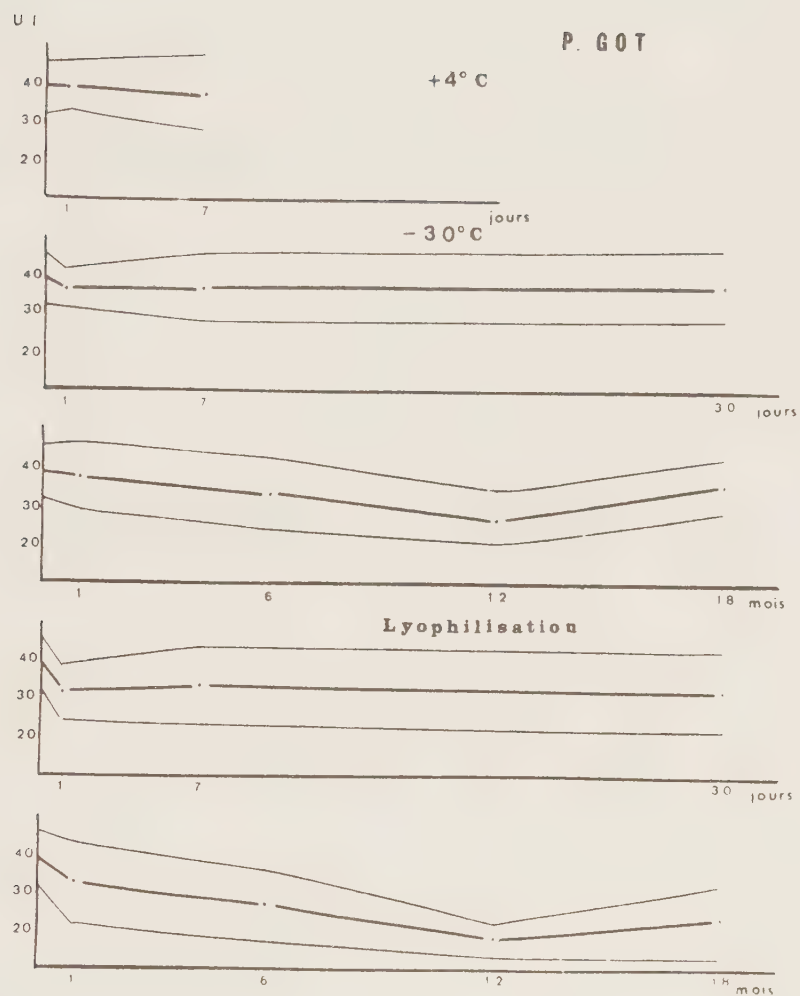


Figure 13 : Conservation de la GOT plasmatique en fonction du temps et de la température.

En fait, le volume théorique nécessaire serait de 4,6 ml. Cette dilution explique la partie décroissante de la courbe entre le premier et le second dosage, 24 heures plus tard (figure 13).

Seuls les résultats compris entre 24 heures et 30 jours (ou 18 mois) sont comparables.

Ils sont présentés dans la figure 13 selon la moyenne des valeurs des différents pools préparés durant 30 jours avec des plasmas de sujets supposés sains.

Ces conditions ont l'avantage d'éliminer les variations individuelles. De plus, pour éliminer les variations dues à l'appareil de jour à jour, chaque point représente la moyenne des essais répartis sur un mois.

L'activité enzymatique tend à décroître de 10 % entre 24 heures et 7 jours.

Elle est stable un mois à -30°C et sous forme lyophilisée puis elle s'abaisse progressivement.

7.4. DOSAGE DANS LES ERYTHROCYTES

Nous avons choisi une méthode simple de mesure de l'activité de la GOT globulaire pour pouvoir effectuer de grandes séries de dosages dans les conditions les plus standardisées possible. Le sang est prélevé sur héparine ainsi que l'ont proposé SZEINBERG (459) et MANUCCI (286). Les dosages sont effectués le jour même.

La plupart des auteurs utilisent le sang total et effectuent des lavages successifs avec des solutions isotoniques de chlorure de sodium pour éliminer les leucocytes et les plaquettes.

Nous avons cependant noté que HAUGH (482) prélève directement les hématies à partir d'un culot de sédimentation et évite par cette méthode la phase de lavage. Cette méthode nous paraît critiquable car la répartition des hématies jeunes et âgées n'est pas homogène. L'activité enzymatique d'une hématie mature est environ quatre fois plus faible que celle des cellules jeunes.

Cette différence pourrait s'expliquer soit par un défaut de pénétration du coenzyme dans la cellule âgée, soit par la disparition progressive de l'équipement mitochondrial au cours de la maturation de la cellule (286).

La perte d'activité n'est que partiellement restaurée après stimulation *in vivo* par le phosphate de pyridoxal (144).

Les méthodes de séparation spécifiques des érythrocytes et des autres cellules sanguines sont rarement utilisées (286).

Le plus souvent, les hématies sont lavées puis hémolysées par choc hypotonique à l'eau distillée avec fragilisation à +4°C.

L'expression des résultats mériterait une plus grande uniformisation. Certains auteurs (479, 482) rapportent l'activité au volume d'hématies par mesure de l'hématocrite sur une aliquote d'hématies lavées ou à un nombre déterminé de cellules (255) en général 10^8 ou 10^9 hématies.

Nous préférons exprimer nos résultats en mU par gramme d'hémoglobine dans 1 ml d'hémolysat, selon RICHTERICH (376) et FISCHER et WALTER (144).

Cette méthode présente l'avantage de mesurer l'activité enzymatique et la grandeur de référence sur un même échantillon quoique un bilan hématologique complet (numération des hématies, hématocrite, VCM, CGMH, TGMH, hémoglobine) soit effectué en parallèle sur le sang total.

7.4.1. Matériel et méthode

7.4.1.1. Réactifs

- I. Solution de NaCl à 9 g/l
- II. Coffrets prêts à l'emploi Boehringer GmbH Mannheim. Méthode optimisée (n° 15923 TGAT)
- III. Solution étalon d'hémoglobine Hém Dos Biotrol à 100 g °/oo, 120 g °/oo, 140 g °/oo, 160 g °/oo
- IV. Sérum étalon Précinorm E (Boehringer GmbH Mannheim)

7.4.1.2. Matériel

- . Centrifugeuse réfrigérée
- . Ensemble microanalytique Eppendorf avec photomètre 1100 M et passeur automatique d'échantillons, thermostaté à 37°C.

7.4.2. Mode opératoire

7.4.2.1. Prélèvement

Le sang est prélevé sur héparinate de lithium.

7.4.2.2. Lavage des hématies et hémolyse

- . pipeter 2 ml d'eau physiologique
- . Prélever 0,4 ml de sang total avec une pipette à écoulement total
- . Rincer la pipette avec l'eau physiologique
- . Centrifuger 10 minutes à 3000 t/mn
- . Eliminer le surnageant en évitant d'entraîner des érythrocytes
- . Laver trois fois les érythrocytes
- . Ajouter 4,8 ml d'eau distillée dans chacun des tubes pour hémolyser les hématies
- . Laisser au repos quinze minutes à +4°C
- . Centrifuger dix minutes à 3000 t/mn pour éliminer les stromas globulaires

Des essais effectués sur 55 prélèvements sanguins différents hémolysés directement ont montré une bonne corrélation avec la méthode originale avec lavage des hématies ($r = 0,92$) (figure 14).

Nous utilisons actuellement la méthode d'hémolyse directe des hématies sans lavage préalable.

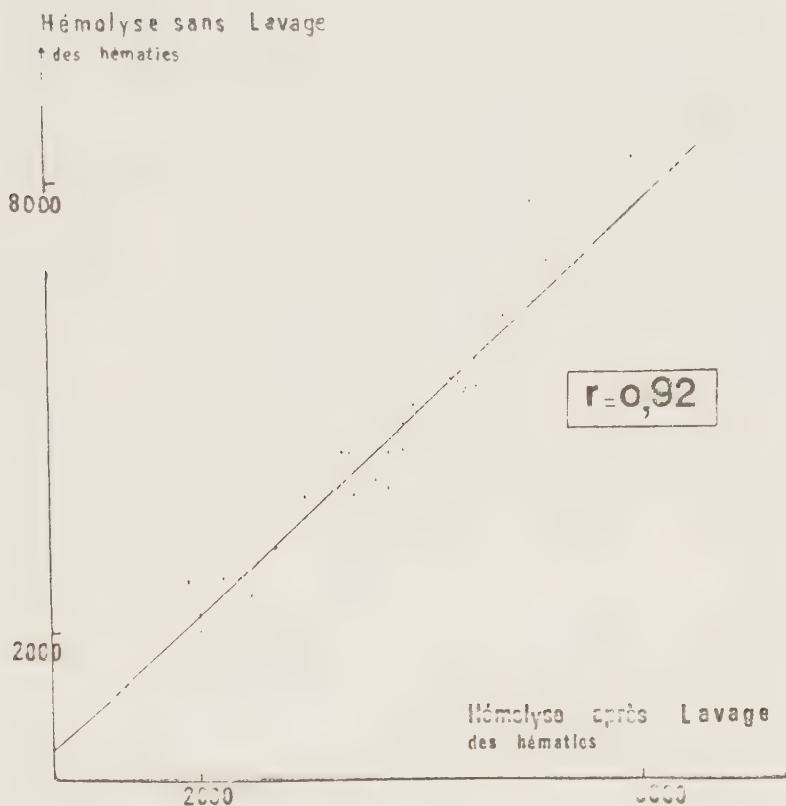


Figure 14 : Corrélation entre les méthodes de dosage de la GOT érythrocytaire avec et sans lavage des hématies.

7.4.2.3. Dosage de l'hémoglobine par la méthode de Drabkin à la cyan-méthémoglobine

La gamme d'étalonnage est établie avec les réactifs III, tous les trois jours.

Le contrôle journalier est effectué à partir des solutions Hémodos (R.III) à 100 g ‰ et 160 g ‰.

7.4.2.4. Mesure de l'activité de la GOT

Les hémolysats sont dilués au demi dans l'eau distillée.

L'activité de la GOT érythrocytaire est mesurée à 37°C en micro-méthode à l'aide des coffrets optimisés (R.II) en double pour chaque hémolysat.

Lire en cuves de 1 cm de trajet optique, à 366 nm.

	TEMOIN	DOSAGE I	DOSAGE II
Sérum étalon Précinorm E (μl)	100		
Hémolysat (μl)		100	100
Mélange réactionnel (R.I.) (μl)	500	500	500
Incuber 5 minutes à 37°C			
Substrat (R.III) (μl)	20	20	20

. Calcul du coefficient (377)

$$\text{mU/ml} = \Delta E/\text{mm} \times 1880$$

Le contrôle journalier est effectué avec un sérum étalon (R.IV).

. Expression des résultats

L'activité de la GOT érythrocytaire est exprimée en mU/gramme d'hémoglobine dans un millilitre d'hémolysat.

7.4.3. Reproductibilité

Elle a été établie à partir d'un même sang sur 10 aliquotes lavées et hémolysées séparément. Le coefficient de variation, de 5 à 8 %, indique une assez bonne reproductibilité de la méthode (tableau 13) malgré les nombreuses manipulations et la difficulté de lecture des enregistrements.

TABLEAU XIII : REPRODUCTIBILITE DU DOSAGE DE LA GOT GLOBULAIRE

Activité en mU/g d'hémoglobine/ml	n	$\bar{m}$	s	ov %
Essai n° 1	10	3927	285	7,2
Essai n° 2	10	6386	624	5,1
Essai n° 3	10	3144	363	8,3

7.5. DANS LES TISSUS

Pour libérer l'enzyme mitochondriale liée aux cristae, il faut recourir à des traitements énergiques tels que les ultrasons (52, 101, 203, 337, 340, 342, 412), les broyeurs type Warring - Blendor ou Ultra Turrax (52, 147, 191, 223, 241, 411, 415), la congélation-décongélation (430), les détergents (408, 409, 422) ou les solvants (54, 224, 313). Les deux isoenzymes sont extraites dans des solutions légèrement hypoosmotiques : tampons phosphate (19, 55, 101, 125, 191, 241, 403, 412), Tris (106), Tris-citrate (43), maléate (54, 223, 224, 342), glutarate de sodium (298, 313) ainsi que l'eau distillée (52, 54, 147, 149, 337, 342, 350, 430).

La quantité d'enzyme extraite est différente selon les solutions employées. D'après les travaux de SCHMIDT (411) le rendement le plus important est obtenu avec une solution de NaCl 0,15 M pH 7,2. En présence d'EDTA il passe à 71 % et 40 % seulement dans l'eau distillée.

Le saccharose 0,25 M en présence de solvants tels que l'acétone ou le butanol, ou de détergents tels que le Triton X 100 est également employé comme solution d'extraction (54, 224, 383). SCHROCKERT (422) ajoute un volume d'une solution de Triton X 100 à 4 % à 9 volumes d'un homogénat de foie au Potter Elvehjem. L'extraction est alors plus complète que par les ultrasons (422).

L'eau distillée est moins efficace que le chlorure de sodium 0,15 M sans EDTA préconisé par SCHMIDT (411, 412) et le saccharose 0,25 M en présence de butanol de BOYD (54).

Les rapports tissus-solvants d'extraction varient selon les auteurs.

Au cours de nos essais, nous avons employé une solution de saccharose 0,25 M-Tris pour extraire la GOT. Pour favoriser au maximum l'éclatement des cellules et des mitochondries, nous avons broyé le foie dans un broyeur Ultra Turrax en présence de Triton X 100.

7.5.1. Réactifs

I. Solution de saccharose 0,25 M - Tris 1 mM
Ajuster à pH 7,4 avec de la potasse 2 N.
Vérifier le pH avant chaque série de manipulations
Conservation une semaine à +4°C.

II. Solution de Triton X 100 (B.L.B) à 1 % dans l'eau distillée

III. Réactif I 900 ml
Réactif II 100 ml

Ajuster à pH 7,4

IV. Solution de NaCl à 9 g °/°.

V. Coffrets Boehringer (Mannheim GmBH, n° 15971 TGAE).

Les mesures de l'activité enzymatique de la GOT sont effectuées à 30°C sur l'ensemble microanalytique Eppendorf avec photomètre 1100 M à passeur automatique d'échantillons.

7.5.2. Etude de l'action du Triton X 100

Nous avons étudié l'influence du Triton X 100 sur la libération de la GOT mitochondriale. Des essais préliminaires ont été effectués sur le plasma pour vérifier l'action de ce détergent sur l'activité enzymatique de la GOT. Nous avons ensuite dosé la GOT dans un homogénat tissulaire contenant des mitochondries en suspension, en présence de Triton X 100 à 1 ‰.

7.5.2.1. Sur la GOT plasmatique

Nous avons vérifié l'influence du Triton X 100 à 1 ‰ sur l'activité de l'enzyme dans le plasma.

Le Triton X 100 à 1 % est dilué au 1/10e dans du plasma.

Dans les témoins, le Triton X 100 est remplacé par une solution de NaCl à 9 g ‰.

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 1.

TABEAU XIV : INFLUENCE DU TRITON X 100 A 1 ‰ DANS LE PLASMA SUR L'ACTIVITE DE LA GOT.

Plasma n°	Sans Triton X 100	En présence de Triton X 100
1	12,5	10,2
2	14,6	13,8
3	11,6	11,6
4	10,8	10,2
5	8,7	8,7
6	11,6	10,2

Le Triton X 100 ne modifie donc pas l'activité de l'enzyme ce qui confirme les observations de SCHROCKERT (422) et HERZFELD (203).

7.5.2.2. Sur un homogénat tissulaire

Le Triton X 100 est ajouté à raison de 1 °/‰ dans le premier surnageant d'un homogénat de foie de rat.

TABEAU XV : INFLUENCE DE L'ACTION DU TRITON X 100 A 1°/‰ SUR L'EXTRACTION DE LA GOT MITOCHONDRIALE

	Absence de Triton X 100 [a]	Addition de Triton X 100 (1 °/‰) [b]
n	9	9
$\bar{m}$	533	724,5
s	41	38,5
cv %	7,8	5
$\frac{b - a}{a} \times 100$	36 %	

Nous constatons une augmentation de l'activité spécifique de 36 % par rapport aux valeurs obtenues en l'absence de Triton.

7.5.3. Méthode utilisée

Les rats à jeûn depuis 20 heures sont sacrifiés par décapitation. Le foie est prélevé dans les deux minutes qui suivent la mort de l'animal et plongé dans le réactif III maintenu dans la glace.

Il est coupé en morceaux et lavé successivement dans cinq béchers contenant le réactif III glacé.

Après avoir été séché, il est pesé et broyé rapidement à l'Ultra-Turrax, dans neuf parties (p/p) de réactif III glacé.

Le temps de broyage est fixé à une minute par paliers de 30 secondes avec un arrêt de 45 secondes entre chaque palier pour éviter tout échauffement. La manipulation est effectuée en chambre froide.

Le broyat est immédiatement centrifugé à 15 000 g pendant 30 minutes.

Le surnageant est décanté.

Les extraits tissulaires sont dilués au 1/200 dans le tampon d'extraction avant le dosage.

7.5.4. Reproductibilité

Les résultats sont répartis dans le tableau 16.

TABEAU XVI : REPRODUCTIBILITE DE L'EXTRACTION TOTALE DE LA GOT A L'ULTRATURRAX DANS UNE SOLUTION DE SACCHAROSE 0,25 M TRIS 1 mM EN PRESENCE DE TRITON X 100 A 1 °/°.

		n	$\bar{m}$	s	cv %
ESSAI N° 1	Activité en mU/g de foie	6	252013	15627	6
	Protéines en mg/g de foie	6	215	14	6,4
	Activité spécifique	6	1180	78	6,6
ESSAI N° 2	Activité en mU/g de foie	5	187610	21890	11
	Protéines en mg/g de foie	5	154	10	6,5
	Activité spécifique	5	1218	88,8	7,3

La reproductibilité de l'extraction totale de la GOT est satisfaisante puisque le coefficient de variation ne dépasse pas 11 % lorsqu'il s'agit de la mesure de l'activité enzymatique du broyat et 6 à 7 % pour le dosage des protéines.

Nous avons appliqué ces méthodes de dosage

- à l'étude du fractionnement subcellulaire et au contrôle de la pureté des fractions isolées de foie de rat.

- à l'étude de la séparation des isoenzymes de la GOT par chromatographie et électrophorèse.

Ces applications font l'objet du huitième chapitre.

Ces mêmes méthodes d'analyse ont été appliquées à l'étude des variations physiologiques de la GOT plasmatique et globulaire.

Ce travail sera présenté dans le neuvième chapitre.

CHAPITRE VIII

EXTRACTION ET SEPARATION DES ISOENZYMES

La séparation des isoenzymes de la GOT peut se faire soit sur un homogénat global, soit après purification par ultracentrifugation. Dans ce dernier cas, la libération des mitochondries de la cellule doit se faire par une désagrégation modérée de la structure cellulaire.

Nous envisagerons donc d'abord :

- . l'homogénéisation du tissu par des procédés mécaniques (broyeurs à piston type Potter Elvehjem, broyeurs à lames type Waring Blendor ou Ultra-Turrax, ultra-sons, congélation-décongélation) ou par des détergents ou des solvants
- . le fractionnement de l'homogénat
- . la séparation des isoenzymes
 - par chromatographie liquide sur colonne
 - par électrophorèse

Nous avons analysé la répartition intracellulaire des isoenzymes de la GOT du foie de rat après séparation fractionnée du cytoplasme et des mitochondries. La chromatographie liquide sur colonne et l'électrophorèse nous ont permis de vérifier la contamination de chacune des fractions.

Enfin, nous avons vérifié l'intégrité de la structure des mitochondries par microscopie électronique.

8.1. HOMOGENEISATION DU TISSU

Au cours de l'homogénéisation du tissu, la structure de la mitochondrie ne doit pas être affectée pour isoler ensuite ces organites cellulaires par ultracentrifugation.

La solution tampon d'extraction doit avoir la même tonicité que le milieu intracellulaire. C'est le cas du saccharose 0,25 M (53,54,55,121, 207, 266, 267, 285, 342, 399, 409, 412, 508). en présence de Tris (342) ou d'EDTA (412,450). NISSELBAUM (342) utilise même deux solutions différentes pour le fractionnement subcellulaire du foie de rat.

L'isoenzyme mitochondriale est isolée dans un milieu saccharose 0,25 M, Tris 0,05 M, KCl 0,05 M, $MgCl_2$ 0,005 M, pH 7,5. Un tampon maléate 0,005 M, EDTA 0,005 M pH 6 est utilisé pour l'extraction de l'isoenzyme cytoplasmique.

Nous avons utilisé une solution de saccharose 0,25 M Tris 1 mM pH 7,4 pour l'étude de la séparation des organites subcellulaires.

Au cours de nos essais sur le mode d'action des biguanides, nous avons séparé les mitochondries dans une solution de mannitol 0,3 M, EDTA 0,1 M pH 7,4 (168,354). En effet nous avons constaté que dans les mitochondries isolées dans le saccharose 0,25 M Tris 1 mM, la phosphorylation n'était pas couplée à l'oxydation du substrat. Ce phénomène a été également observé par MINN (319).

Par contre cet effet n'est pas observé lorsque les mitochondries sont isolées dans la solution de mannitol.

Notre étude sur le fractionnement subcellulaire a été effectuée uniquement avec la solution de saccharose 0,25 M, Tris 1 mM.

L'homogénéisation modérée du tissu se fait avec un broyeur à piston type Potter Elvehjem.

8.1.1. Choix de la durée d'homogénéisation

Chaque homogénéisation est faite en double avec l'appareil Potter Elvehjem. Les temps sont fixés à

- 12 secondes soit un mouvement du piston
- 24 secondes soit deux mouvements du piston
- 36 secondes soit trois mouvements du piston
- 42 secondes soit quatre mouvements du piston
- 60 secondes soit cinq mouvements du piston

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 15. L'extraction de la GOT est donc maximum entre 42 et 60 secondes. Nous avons retenu ce dernier temps.

8.1.2. Choix du nombre de mouvements du piston

Lorsque le temps de broyage reste fixé à 60 secondes, l'extraction de la GOT ne varie pas si le nombre de mouvements du piston passe de cinq à dix. (figure 15).

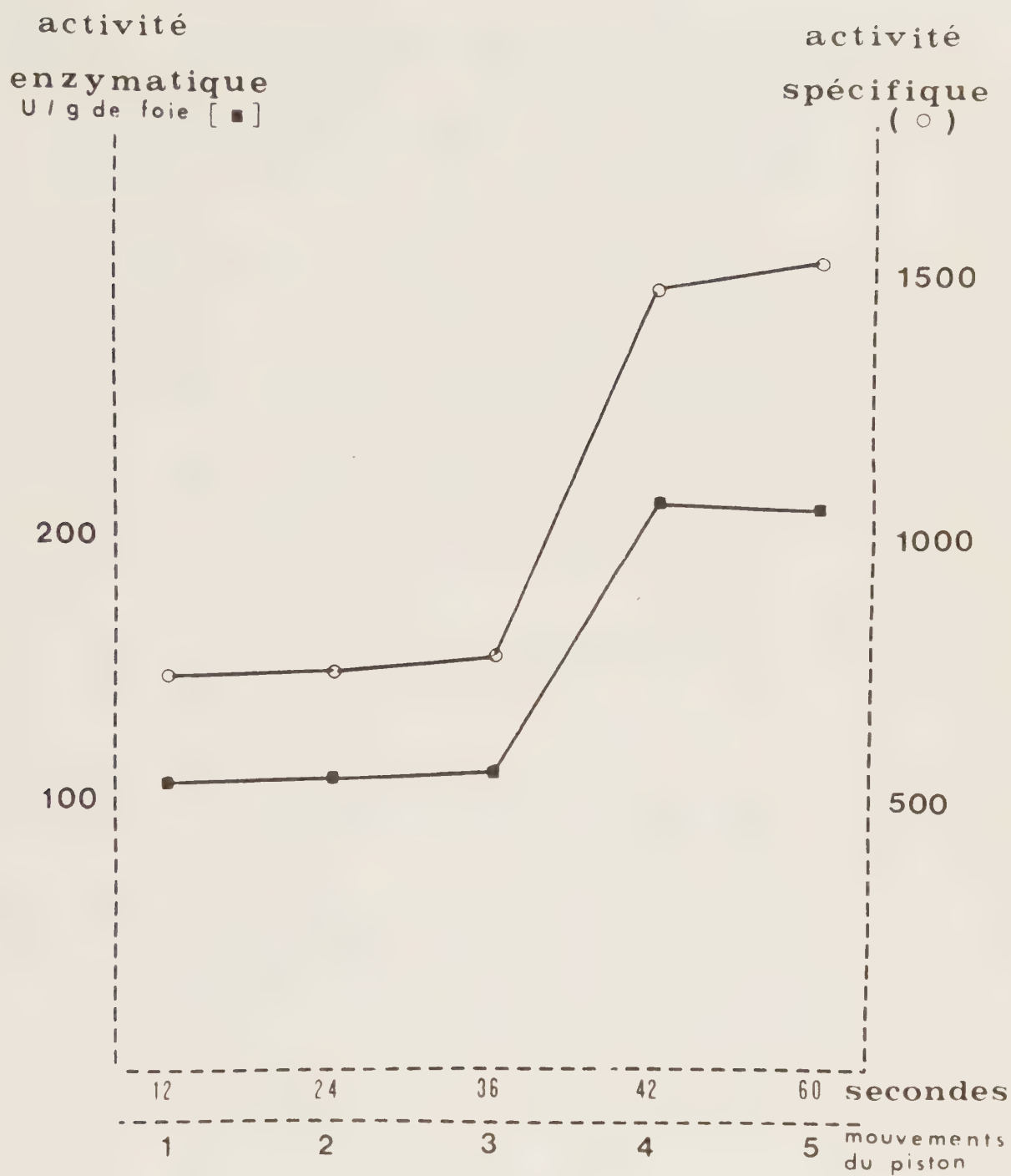


Figure 15 : Etude de l'extraction de la GOT avec un homogénéiseur type Potter Elvehjem en fonction du temps.

8.1.3. Méthode utilisée

Le foie de rat est homogénéisé à l'aide de l'appareil Potter Elvehjem. Le piston est maintenu dans le fond du tube jusqu'à ce que le foie soit totalement dissocié.

L'homogénéisation se poursuit par cinq aller-retours du piston, tournant à 1 000 tours par minute, pendant une minute.

Le tube est plongé dans la glace pendant cette opération. L'homogénat est centrifugé à 600 g (soit 3 000 t/mn) pendant dix minutes à la température de 3°C ($\pm 1^\circ$)

Les noyaux, les cellules non éclatées au cours de l'homogénéisation et des mitochondries sédimentent au fond du tube.

Le surnageant est décanté. Il est appelé "premier surnageant".

8.1.4. Reproductibilité de la méthode

Les résultats sont présentés dans le tableau 17.

Le coefficient de variation du dosage de la GOT dans un homogénat de foie de rat est de 3 % à 7 %. Le dosage des protéines varie de 1 % à 7 %.

La dispersion des résultats est due à la longueur des manipulations (homogénéisation, centrifugation, décantation) et aux grandes dilutions utilisées en particulier au cours de la mesure de l'activité de la GOT hépatique (1/200).

TABEAU XVII : REPRODUCTIBILITE DE L'HOMOGENEISATION DU FOIE DE RAT
DANS UNE SOLUTION DE SACCHAROSE 0,25 M-TRIS 1mM.
Les dosages sont effectués sur le premier surnageant.

		n	$\bar{m}$	s	c.v %
ESSAI N° 1 (25° C)	Activité en mU/g de foie	6	68166	2636	3
	Protéines en mg/g de foie	6	132	2	1
	Activité spécifique	6	514	21	4
ESSAI N° 2 (25° C)	Activité en mU/g de foie	5	100700	3271	3,2
	Protéines en mg/g de foie	5	139	2,8	2
	Activité spécifique	5	726	28,7	4,3
ESSAI N° 3 (30° C)	Activité en mU/g de foie	6	153340	10716	6,9
	Protéines en mg/g de foie	6	150	10	6,9
	Activité spécifique	6	1026	86,6	8,4

8.2.- FRACTIONNEMENT DE L'HOMOGENAT

8.2.1. Ultracentrifugation

Plusieurs procédés d'ultracentrifugation sont utilisables :

- . Centrifugation différentielle en milieu homogène : les organites sédimentent à des vitesses différentes selon les tailles et densités de leurs constituants.

Mais cette méthode favorise la contamination et la production de courants de convection.

- . Centrifugation en gradient de densité. Elle veut éviter ces inconvénients.

Par centrifugation différentielle en gradient, la séparation est obtenue par différence de vitesses de sédimentation des particules dans un gradient faible.

Par centrifugation en gradient isopycnique, les particules se trouvant dans une solution dont le gradient est élevé, migrent selon leur densité dans la zone du gradient de même densité.

Dans ce cas, la séparation est due uniquement aux différences de densité des organites.

Le meilleur fractionnement est réalisé dans des rotors zonaux, et non dans des rotors à angle fixe ou à godets basculants.

Nous avons utilisé la technique par centrifugation différentielle selon HOGEBOOM (210).

Elle nécessite une vigilance particulière pour éviter toute altération morphologique, biochimique ou fonctionnelle des organites isolés.

8.2.1.1. Méthode utilisée

Le premier surnageant est centrifugé à 8 000 g (soit 11 500 t/mm) pendant 15 minutes à la température de 3°C (+ 1°)

Après cette première centrifugation des mitochondries, la couche graisseuse ainsi que le liquide surnageant sont prélevés. Ce liquide, ou deuxième surnageant, est conservé au froid. Le culot obtenu, de couleur crème, constituant le sédiment mitochondrial, est remis en suspension dans le saccharose 0,25 M glacé à l'aide d'un agitateur en verre Micromix.

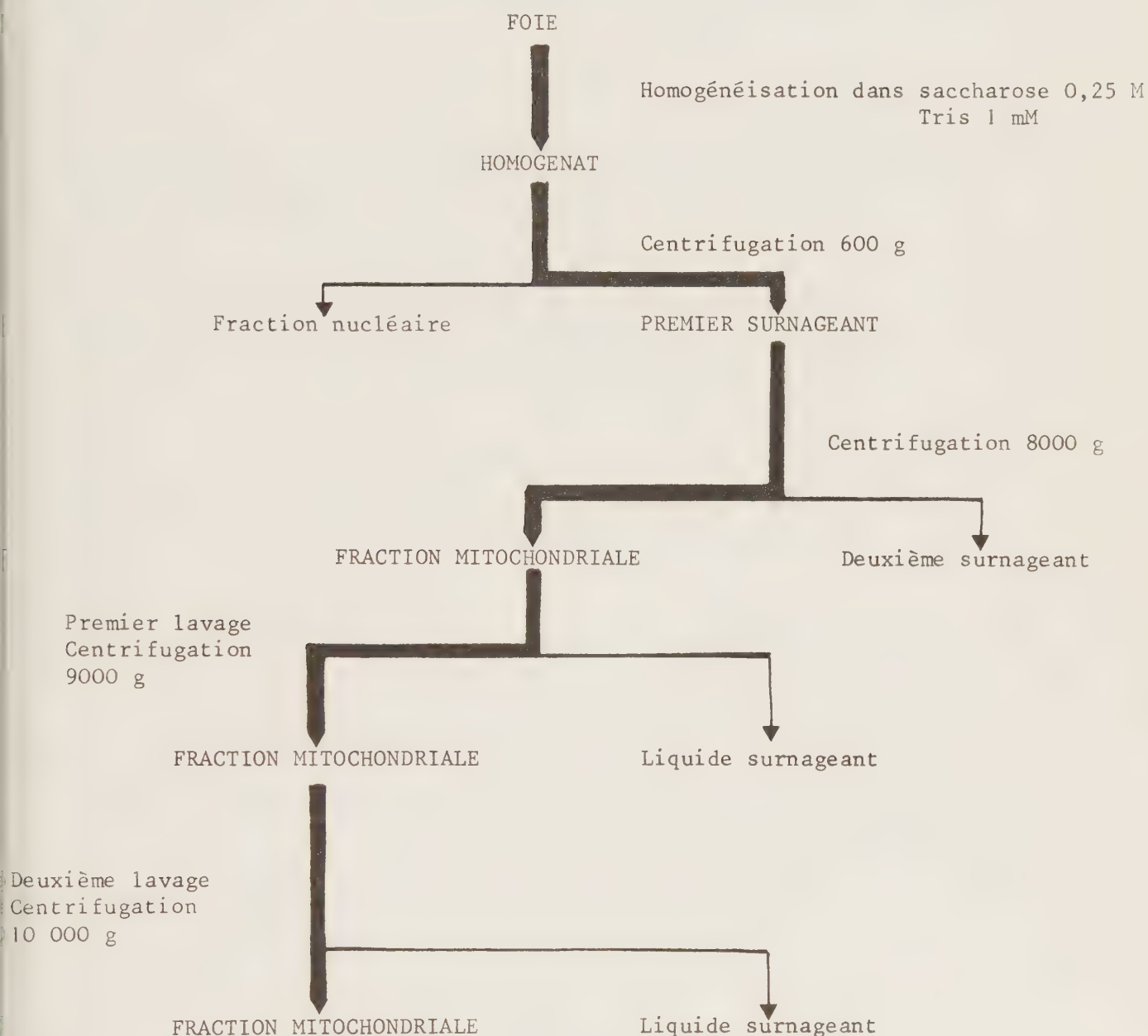


Figure 16 : Schéma de fractionnement subcellulaire

La fraction mitochondriale est à nouveau sédimentée à 9 000 g (soit 12 250 t/mm) pendant 15 minutes. Le lavage est répété une seconde fois, à 10 000 g (soit 13 000 t/mm) pendant 15 minutes (figure 16).

La fraction mitochondriale est mise en suspension dans un volume de solution de saccharose 0,25 M, Tris 1 mM, égal au volume du liquide décanté.

8.2.1.2. Conservation des mitochondries

Il est nécessaire que toutes les opérations réalisées précédemment soient faites rapidement et dans des conditions bien déterminées, car la stabilité de la fraction mitochondriale est limitée. Le tube de mitochondries est maintenu dans la glace entre les différentes centrifugations.

L'ensemble des manipulations se fait en chambre froide à +4°C. Il est possible d'améliorer la stabilité des mitochondries en ajoutant au milieu réactionnel de la L histidine (86), ATP ou substrats oxydables à pH neutre (128).

8.2.1.3. Reproductibilité de la méthode

La dispersion des résultats obtenus s'explique par le grand nombre de manipulations au cours de cette méthode : décantation, remise en suspension...

Les résultats sont présentés dans les tableaux 18-19.

8.2.2. Contrôle biochimique et morphologique des fractions

Nous avons contrôlé la pureté des fractions obtenues par ultracentrifugation d'un homogénat de foie de rat par

- chromatographie liquide sur colonne
- électrophorèse
- microscopie électronique

Le contrôle physiologique par la mesure de la respiration des mitochondries est développé dans la troisième partie de notre travail.

TABEAU XVIII : REPRODUCTIBILITE DE LA SEPARATION DE L'ISOENZYME
CYTOPLASMIQUE DE LA GOT PAR ULTRACENTRIFUGATION.
Les résultats sont exprimés en activité spécifique.

	n	$\bar{m}$	s	cv %
Essai n° 1 (25°C)	9	353,7	37,5	10,6
Essai n° 2 (25°C)	6	283	10,9	3,8
Essai n° 3 (30°C)	6	416	46	11

TABEAU XIX : REPRODUCTIBILITE DE LA SEPARATION DE L'ISOENZYME
MITOCHONDRIALE DE LA GOT PAR ULTRACENTRIFUGATION.
Les résultats sont exprimés en activité spécifique.

	n	$\bar{m}$	s	cv %
Essai n° 1 (25°C)	6	1413	87,5	6,2
Essai n° 2 (25°C)	5	2123	273,3	11,2
Essai n° 3 (30°C)	6	1818	292	16

8.2.2.1. Activité de la GOT dans chacune des fractions

Le dosage de l'activité enzymatique est effectué en présence de Triton X 100 ajouté extemporanément à raison de 1 ‰ à chacune des fractions.

Les culots de centrifugation sont remis en suspension dans un volume de solution de saccharose 0,25 M, Tris 1 mM, Triton X 100 1 ‰, égal au volume décanté et rebroyés à l'Ultra Turrax. Après une nouvelle centrifugation, l'activité de la GOT est mesurée dans les surnageants.

Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux 20-21.

La proportion d'enzyme extraite par homogénéisation au Potter-Elvehjem, représente 86 % seulement de celle obtenue avec l'Ultra Turrax (tableau 21). L'activité enzymatique de la fraction nucléaire après un nouveau broyage à l'Ultra-Turrax est de 25 % et celle du premier surnageant 61 %. Deux lavages successifs du culot mitochondrial sont suffisants puisque l'activité du dernier liquide de lavage représente 0,5 % seulement de l'activité totale.

En rapportant les activités spécifiques des différentes fractions à celle du broyat total, nous observons une légère purification (1,5 fois) de l'enzyme mitochondriale. Par contre, l'activité spécifique du deuxième surnageant contenant l'enzyme cytoplasmique est environ 3 fois plus faible.

A partir des valeurs de l'activité enzymatique en mU/ml et du taux de protéines en mg/ml, trouvées dans chacune des fractions, nous avons construit un histogramme, représentant la répartition de la GOT dans les différentes fractions isolées (figure 17).

Pour construire cet histogramme, nous portons en abscisse $\frac{n}{N}$ où n représente le taux de protéines dans une fraction donnée et N le taux de protéines dans toutes les fractions considérées. et en ordonnée $\frac{q}{Q} \times \frac{n}{N}$

où q est l'activité enzymatique dans la fraction considérée et Q l'activité dans l'ensemble des fractions.

TAB. IX : ACTIVITE DU CATALASE DANS CHAQUE DES FRACTIONS SUBCELLULAIRES OBTENUES A PARTIR D'UN SANG DE RAT PAR ULTRACENTRIFUGATION
 APRES ACTIVATION THERMIQUE A 100 A 1 °/30 (30°C)

	n	Activité enzymatique en mU/g de foie (+ s)	Protéines en mU/g de foie (+ s)	Activité spécifique (+ s)
Broyat total	6	252.013	215	1180
Homogénat : premier surnageant	6	153 340	150	1026
Fraction nucléaire	6	63.632	106	1510
Homogénat : deuxième surnageant	6	46.460	112	416
Homogénat : troisième surnageant	6	5 518	17	404
Homogénat : quatrième surnageant	6	1.282	4,4	301
Culot de mitochondries	6	97.990	60	1818

TABEAU XXI : POURCENTAGE D'ACTIVITE DE LA GOT ET DE LA CONCENTRATION EN PROTEINES DE CHACUNE DES FRACTIONS OBTENUES AU COURS DE L'ULTRACENTRIFUGATION PAR RAPPORT A CELLE D'UN BROYAT TOTAL A L'ULTRA TURRAX.

	Activité enzymatique	Protéines	Degré de purification
Broyat total (%)	100	100	1,0
Premier surnageant (%)	61	70	0,87
Fraction nucléaire (%)	25	49	1,28
Deuxième surnageant (%)	18,5	52	0,35
Troisième surnageant (%)	2	8	0,34
Quatrième surnageant (%)	0,5	2	0,25
Culot de mitochondries (%)	39	28	1,54

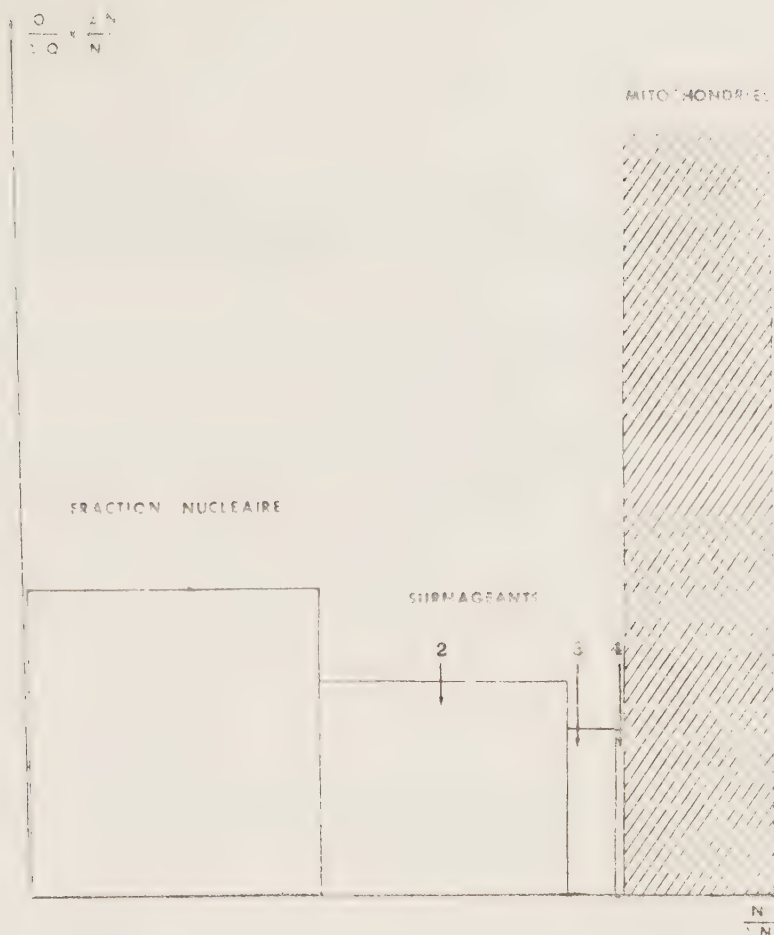


Figure 17 : Représentation graphique de la répartition de la GOT dans les différentes fractions subcellulaires.

Le pourcentage de perte de l'activité enzymatique au cours des manipulations est environ de 15 %.

En effet, si U représente l'activité de l'enzyme extraite à l'Ultra-Turrax, S_1 celle du premier surnageant de l'homogénat au Potter Elvehjem et N l'activité de la fraction nucléaire, le pourcentage de récupération après l'homogénéisation est de 86 %.

$$\left(\frac{S_1 + N}{U} \right) \times 100 = 86 \%$$

De même, si nous appelons S_2 , S_3 , S_4 et M, les activités des surnageants et du culot de mitochondries, l'activité récupérée après ultracentrifugation représente 98,6 % de l'activité de S_1 .

$$\left(\frac{S_2 + S_3 + S_4 + M}{S_1} \right) \times 100 = 98,6 \%$$

Les pertes les plus importantes apparaissent donc au cours de l'homogénéisation et de la première centrifugation.

8.2.2.2. Contrôle par chromatographie sur colonne

Du broyat total

L'isoenzyme mitochondriale représente en moyenne $73 \% \pm 9$ de l'activité totale (tableau 22)

Du premier surnageant

Il renferme en moyenne $42,4 \%$ d'enzyme mitochondriale et $57,6 \%$ d'enzyme cytoplasmique (tableau 23).

Les essais sont effectués sur des homogénats autres que ceux utilisés pour l'électrophorèse.

Du deuxième surnageant

La contamination par l'isoenzyme mitochondriale reste importante : $34,8 \%$ (tableau 24).

Ce chiffre représente le nombre de mitochondries éclatées au cours de l'homogénéisation et de l'ultracentrifugation. Il s'ajoute à la quantité de mitochondries éliminées dans le culot nucléaire et entraîne ainsi une proportion plus faible de l'activité enzymatique dans le culot mitochondrial (tableaux 20 et 21).

TABEAU XXII : SEPARATION DES ISOENZYMES DE LA GOT A PARTIR DU BROYAT
TOTAL PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE CELLULOSE DE 52

	n	$\bar{m}$	s	cv %
Isoenzyme cytoplasmique %	5	26,8	9,3	34,5
Isoenzyme mitochondriale %	5	73,2	9,3	12,6

TABEAU XXIII : SEPARATION DES ISOENZYMES DE LA GOT A PARTIR DU PREMIER
SURNAGEANT, PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE CELLULOSE
DE 52

	n	$\bar{m}$	s	cv %
Isoenzyme cytoplasmique %	5	57,6	11	19,3
Isoenzyme mitochondriale %	5	42,4	11	26,3

TABEAU XXIV : SEPARATION DES ISOENZYMES DE LA GOT A PARTIR DU DEUXIEME
SURNAGEANT (PHASE SOLUBLE) PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE
DE CELLULOSE DE 52

	n	$\bar{m}$	s	cv %
Isoenzyme cytoplasmique %	9	65,2	4,8	7,3
Isoenzyme mitochondriale %	9	34,8	4,8	13,7

8.2.2.3. Contrôle par microscopie électronique

L'observation au microscope électronique nous permet de vérifier la composition de la fraction mitochondriale isolée précédemment, ainsi que de détecter et d'évaluer les contaminations possibles ou les artefacts introduits pendant l'homogénéisation.

Avec l'observation au plus fort grossissement, il est possible de conclure à l'obtention de mitochondries entières (figures 10 et 11) avec les deux milieux utilisés (saccharose et mannitol). Des réserves sont toutefois à faire car il est difficile de différencier les dommages subis par les mitochondries au cours du fractionnement de ceux dûs à la méthode de fixation.

DE DUVE (107) préconise une méthode par filtration Millipore des différents organites cellulaires séparés puis fixation, coloration et observation au microscope électronique de ces éléments répartis sur les filtres suivant leur taille particulière.

Le simple examen au microscope électronique n'est qu'un contrôle relativement grossier et rapide de la pureté. Il ne permet pas de conclure à la présence d'organites fonctionnellement convables.

8.2.3. Discussion

Nous avons isolé les fractions subcellulaires dans un double but de séparation des isoenzymes de la GOT et d'isolement de mitochondries fonctionnelles.

Les dosages de l'activité de la GOT et des protéines dans les différentes fractions permettent d'évaluer d'une part, l'enrichissement enzymatique du deuxième surnageant et de la fraction mitochondriale, d'autre part, les pertes au cours des manipulations successives.

Peu de travaux mentionnent le pourcentage de récupération des protéines dans les différentes fractions. JUCHAU (228) attire l'attention sur l'importance du choix de la méthode de dosage des protéines dans les fractions subcellulaires.

En effet, les valeurs obtenues dans l'homogénat total et le deuxième surnageant par la méthode au biuret sont inférieures à celles obtenues par la méthode de LOWRY. Par contre, le dosage des protéines mitochondriales par la méthode au biuret, donne des résultats plus élevés. Seules les concentrations en protéines dans la fraction nucléaire, sont voisines.

La spécificité de la méthode au biuret pour le dosage des protéines du deuxième surnageant est donc supérieure à celle de LOWRY. Cette fraction subcellulaire contient en effet des quantités élevées d'acides aminés libres et d'acides nucléiques qui interfèrent dans la réaction colorée de LOWRY.

Nous avons également observé une concentration en protéines très élevée dans le deuxième surnageant, par la méthode de LOWRY. Le manque de spécificité de cette méthode, est mis en évidence par un pourcentage de récupération, de 128 %, si nous rapportons la somme des concentrations des différentes fractions protéiques subcellulaires à celle du premier surnageant.

Quant au pourcentage de récupération de l'activité enzymatique, il atteint 98,6 %. SCROCKERT (422) ne retrouve que 70 % $\pm$ 12,7 de l'activité initiale alors que SCHMIDT (411) n'observe pas de pertes.

Pourtant, l'activité du premier surnageant représente seulement 61 % de l'activité du broyat total. Ce pourcentage est plus faible que celui rapporté par SCHMIDT (411) travaillant sur du foie humain.

REITH (372) et DE DUVE (107) ont mis en évidence le manque de spécificité du fractionnement subcellulaire par ultracentrifugation différentielle en milieu isotonique. Nos résultats montrent effectivement une perte importante de GOT et de protéines dans la fraction nucléaire. HOGEBOOM et SCHNEIDER (209) admettent une perte de 30 % des mitochondries à ce stade.

D'autre part, nous avons mis en évidence l'hétérogénéité du deuxième surnageant. Cette fraction contient non seulement la GOT cytoplasmique, mais également 40 % de GOT mitochondriale. Cette contamination a déjà été observée par REITH (372). Selon WATTIAUX (489), le nombre de mitochondries éclatées est proportionnel à la vitesse de centrifugation.

En plus des difficultés d'ordre technique, viennent s'ajouter celles d'ordre physiologique.

WALTER et ANABITARTE (487) montrent en effet que des mitochondries de rats à jeûn sont plus fragiles et par conséquent libèrent plus d'enzymes lors de l'homogénéisation. C'est pourquoi nous avons limité à 20 heures l'état de jeûne chez les rats utilisés au cours de nos essais in vitro sur mitochondries entières.

Les résultats obtenus au cours de notre étude sur le fractionnement subcellulaire, leur mauvaise reproductibilité, nous prouvent qu'il est dangereux d'utiliser comme méthode d'extraction de la GOT une simple homogénéisation, suivie d'une centrifugation à faible vitesse. De même, il est difficile d'admettre certains résultats, publiés dans la littérature, concernant les variations physiologiques des isoenzymes de la GOT, obtenus par des méthodes de fractionnement subcellulaire par ultracentrifugation.

8.3. SEPARATION DES ISOENZYMES

8.3.1. Chromatographie liquide sur colonne

Elle a pour but de préparer et de purifier des quantités importantes d'isoenzymes. Nous l'avons également utilisée pour contrôler la pureté des fractions subcellulaires obtenues par ultracentrifugation.

8.3.1.1. Choix du support

Les premiers travaux de purification de cette enzyme ont été réalisés en 1959 par JENKINS (223) sur colonne d'hydroxylapatite, et WADA (484), PATRAMANI (360), MARINO (292) ont également utilisé ce support avec succès.

Puis au cours des dernières années, les celluloses échangeuses d'ions type DEAE cellulose (39, 55, 56, 147, 148, 341, 342, 412) et CM cellulose (39, 42, 313, 340) ou les gels de dextrane échangeurs d'ions ont souvent été employés (164, 224, 285, 298, 419).

Parmi les études les plus poussées actuellement, il faut citer MICHUDA, MARTINEZ-CARRION (313, 297) qui utilisent des chromatographies successives pour la purification des sous-unités de chaque isoenzyme.

8.3.1.2. Choix des tampons d'élution

L'élution se fait :

- soit par étapes (223, 412, 419)
- soit par un gradient de force ionique (42, 55, 67, 285) ou de pH (55, 56, 412)

Dans le premier groupe se rangent les méthodes de JENKINS (223) et de SCHMIDT (419) qui utilisent deux solutions tampons de phosphate pH 7,40, 8 mM pour l'une et 200 mM en phosphate - NaCl pour l'autre. BODANSKY (342) leur substitue un tampon TRIS-acétate pH 7,5 avec un gradient de force ionique de 5 à 100 mM.

BOYDE T.R.C. (55,56) réalise à la fois un gradient de force ionique et de pH avec cinq tampons phosphate de molarité croissante.

MICHUDA, MARTINEZ-CARRION (297,313) associent un support et des solutions différentes.

L'enzyme d'origine mitochondriale est fixée sur une colonne de carboxyméthyl-Sephadex G 50 et éluée par une solution de phosphate de potassium pH 6,8 et un gradient linéaire de chlorure de potassium. L'enzyme d'origine cytoplasmique par contre, est purifiée par un premier passage sur colonne de DEAE cellulose, l'éluant étant un tampon phosphate de potassium 20 mM pH 7,4, puis un second passage sur colonne de carboxyméthyl-Sephadex et élution par un gradient de solutions tampons acétate de sodium pH 5,3.

Le choix du support, des solutions tampons d'élution est donc vaste. D'une façon générale, l'enzyme d'origine mitochondriale est éluée en premier par le tampon de force ionique la plus faible.

Cette méthode permet une purification rapide des isoenzymes (285) avec 100 % + 30 % de récupération (55, 412, 419).

Les isoenzymes sont purifiées jusqu'à 40 fois lorsque la chromatographie sur DEAE cellulose est associée à un traitement par un solvant, puis par le sulfate d'ammonium et par la chaleur (54).

Nous utilisons comme support de chromatographie liquide sur colonne, une cellulose échangeuse d'anions précyclée. Une élution par étapes à l'aide de deux tampons de force ionique croissante permet la séparation des deux isoenzymes de la GOT.

8.3.1.3. Matériel et réactifs

- Ensemble pour chromatographie sur colonne Gilson
- Colonne Pharmacia de 22 cm x 1,5 cm

- I. Phosphate disodique 8 mM pH 7
- II. Phosphate disodique 0,2 M
Chlorure de sodium 0,2 M pH 7
- III. Cellulose DE 52 Whatman
- IV. Phosphate disodique 8 mM pH 4,5

8.3.1.4. Mode opératoire

Nous avons adopté la méthode de SCHMIDT (412,419) sur DEAE cellulose type DE 52 Whatman échangeuse d'anions.

La capacité de ce type de cellulose précyclée est améliorée par un conditionnement préalable comprenant différents stades :

- gonflement de la poudre dans une solution de tampon phosphate 8 mM, pH 4,5
- élimination des particules fines
- dégazage
- équilibre dans la colonne jusqu'à obtention d'un éluat de pH 7.

Il est indispensable de dégazer au préalable toutes les solutions tampons utilisées pour le conditionnement de la DEAE cellulose ainsi que pour l'élution et de maintenir la colonne à +4° tout au long du travail.

Les celluloses anioniques présentent en effet une grande affinité pour l'anhydride carbonique et les précautions précédentes améliorent la reproductibilité de la méthode.

Dépôt

Pour une colonne de 22 cm de haut et 1,5 cm de large, nous déposons de 2 à 3 mg de protéines.

Elution

Les deux isoenzymes sont séparées par une élution discontinue à l'aide de deux solutions tampons, dégazées extemporanément et maintenues à +4°C.

Réactif I : 50 ml

Réactif II : 50 ml

Le débit est réglé à 0,20 ml par minute. Le volume des fractions collectées est de 5 ml. Dans ces conditions, la durée de la chromatographie est de 5 heures. La mesure de l'activité enzymatique, du taux de protéines et la séparation électrophorétique sont effectuées sur les tubes 3 à 12.

8.3.1.5. Résultats

Dans les conditions décrites, nous avons séparé les isoenzymes de l'aspartate aminotransférase d'un homogénat de foie de rat. La forme mitochondriale est éluée en premier par 20 ml de solution tampon phosphate 8 mM.

La deuxième isoenzyme est éluée par 45 à 50 ml de tampon phosphate 0,2 M, chlorure de sodium 0,2 M. (tableau 25).

TABEAU XXV : CHROMATOGRAPHIE D'UN HOMOGENAT DE FOIE DE RAT APRES CENTRIFUGATION
A 600 g

Produit	Volume total ml	Activité mU/ml	Protéines mg/ml	Activité/fraction		Activité spécifique	Degré de purification
				GOT mU	Protéines mg		
Homogénat de foie de rat	0,2	16045	12	3209	2,4	1337	1
Tube n° 4	5	218,6	0,02	1093	0,10	10930	8,2
Tube n° 5	5	29,5	0,01	147,5	0,05	2950	2,2
Tube n° 6	5	11,6	0,01	58	0,05	1160	0,9
Tube n° 7	5	11,6	0,05	58	0,05	2320	1,7
Tube n° 8	5	13,1	0,05	65,5	0,025	2620	1,9
Tube n° 9	5	28,1	0,01	140,5	0,05	2810	2,1
Tube n° 10	5	151,7	0,01	758,5	0,05	15170	11,34
Tube n° 11	5	143,5	0,14	717,5	0,7	1025	0,8
Tube n° 12	5	11,6	0,02	58	0,1	580	0,4

Cette dernière présente en effet une affinité plus grande pour le support et elle ne peut être déplacée qu'en augmentant la force ionique du tampon d'élution initial ; mais la concentration saline élevée du second tampon entraîne à la suite de l'isoenzyme, la majorité des protéines présentes.

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 18 dans laquelle apparaît le pic étroit et symétrique de l'isoenzyme mitochondriale puis celui, plus étalé, de l'isoenzyme cytoplasmique. Le pourcentage de récupération et la reproductibilité de la méthode sont satisfaisants (tableau 26).

Si l'élution de l'isoenzyme cytoplasmique est moins sélective que celle de la forme mitochondriale, le tableau 26 met en évidence, non seulement la séparation des deux isoenzymes, mais aussi leurs activités spécifiques nettement plus élevées. La chromatographie réalise donc simultanément la purification de chacune. La GOT I est purifiée jusqu'à 27 fois lorsqu'on dépose le deuxième surnageant. La purification d'un culot de mitochondries par chromatographie sur colonne est supérieure à 40 fois.

TABEAU XXVI : REPRODUCTIBILITE DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE "DE 52"
Les résultats sont exprimés par rapport à l'activité enzymatique totale de l'éluat.

	n	$\bar{m}$	s	cv %
Isoenzyme cytoplasmique %	5	45	2	4
Isoenzyme mitochondriale %	5	55	2,5	5
Pourcentage de récupération	5	94	6	6

8.3.1.6. Discussion

Dans la technique originale de SCHMIDT (419), le support utilisé est un gel de dextrane échangeur d'ions. La dispersion des résultats avec ce support est environ 5 fois plus élevée que celle que nous avons obtenue avec la cellulose DE 52. Il est connu en effet, que les gels de dextrane échangeurs d'ions type Sephadex, fixent de façon irréversible une certaine proportion de protéines.

La séparation des isoenzymes de la GOT à partir d'un broyat de foie de rat (tableau 22) nous a donné des résultats équivalents à ceux publiés par SCHMIDT (419) : 79 % d'isoenzyme I et 21 % d'isoenzyme II.

**ACTIVITE
ENZYMATIQUE**
(μ / tube)

PROTEINES
(mg / tube)

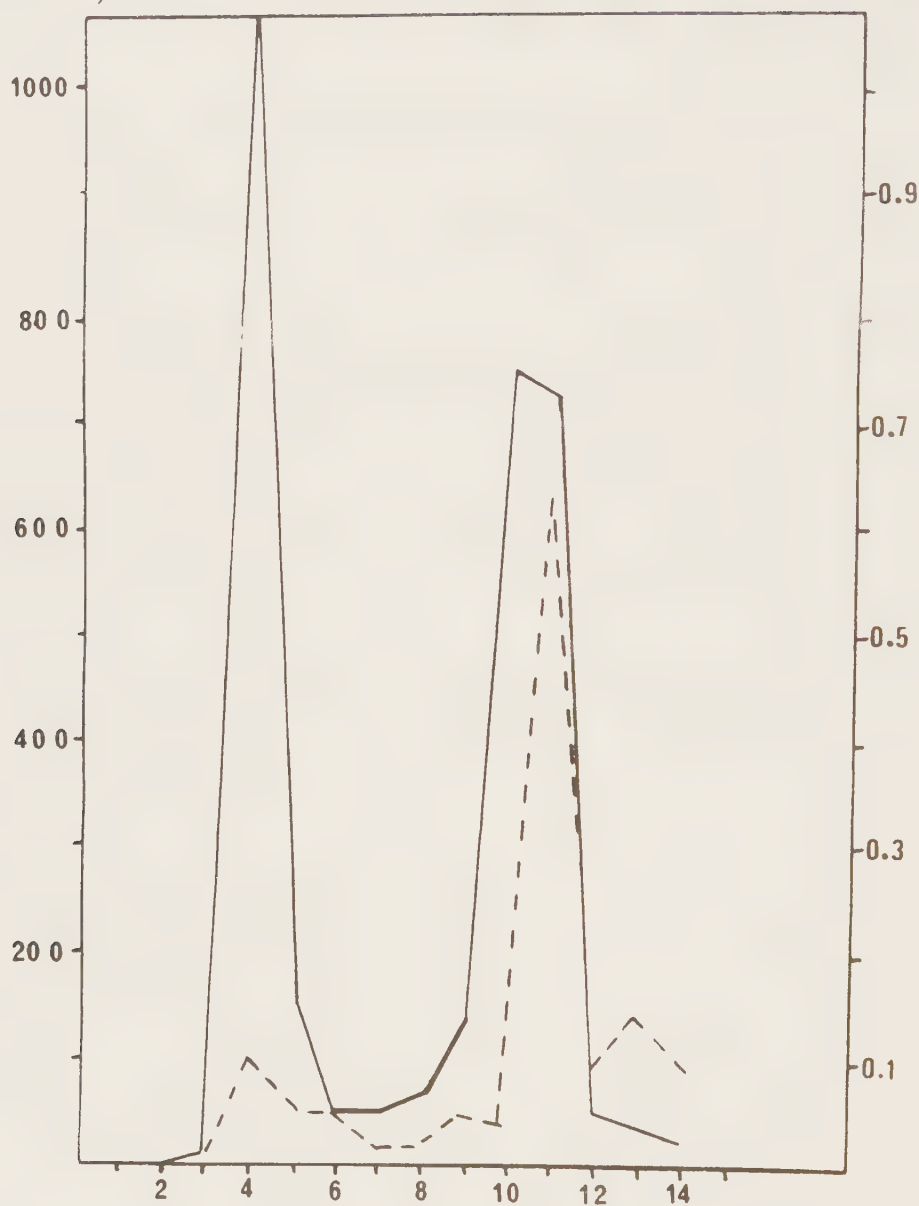


Figure 18 : Séparation des formes moléculaires de la GOT par chromatographie sur colonne de cellulose DE 52.

8.3.2. Electrophorèse

La séparation des isoenzymes est plus rapide par électrophorèse que par chromatographie. Lorsque de petites séries d'échantillons doivent être analysées simultanément, l'électrophorèse est d'utilisation plus simple.

8.3.2.1. Conditions de migration

Le gel d'amidon est le plus fréquemment employé (39, 43, 75, 101, 106, 121, 144, 163, 313, 340, 341, 351, 424). Mais le gel d'agar (52, 53, 496), le papier (52, 147, 285, 409) ou surtout de nouveaux supports tels que le gel de polyacrylamide (19, 55, 285), l'acétate de cellulose (121, 191, 285), l'acétate de cellulose gélatineux (67, 141, 170, 286, 360) ont été préconisés. L'électrophorèse sous haute tension (412, 421) et l'électrofocusing (52, 121, 403) sont utilisés plus rarement.

Le choix des tampons varie avec les auteurs. Il faut signaler que les enzymes peuvent être protégées pendant la migration par de l'albumine bovine ajoutée à l'échantillon (106, 163, 409).

Localisation de l'enzyme sur le support

Elle est définie par la révélation de l'oxaloacétate libéré après contact avec les substrats (acide aspartique, acide 2-oxoglutarique) et le coenzyme, le phosphate de pyridoxal.

Les méthodes colorimétriques

Elles sont basées sur la transformation d'un sel de diazonium en sel de formazan. Le sel de diazonium de la 6 benzamido 4 méthoxy-m-toluidine ou Azoène Fast Violet B préconisé par BABSON (163) est utilisé par DECKER et RAU pour la révélation des bandes d'électrophorèse (106). La coloration est rapide mais le support est également coloré.

Les méthodes fluorimétriques

L'oxaloacétate est transformé en malate en présence de NADH. BOYD J.W. (52,53) réalise ainsi un dosage semi-quantitatif en appréciant la disparition de la fluorescence en fonction du temps.

Les deux méthodes précédentes permettent de localiser les deux formes de l'enzyme. La forme cytoplasmique ou I migre entre les α_2 et les β globulines. Elle est encore appelée anionique. La forme mitochondriale ou II migre au niveau des γ globulines. Elle est encore appelée cationique.

Dosage de l'activité enzymatique de chaque bande

Les bandes sont découpées, éluées et dosées selon la méthode spectrophotométrique de KARMEN (46, 121, 147) ou les méthodes colorimétriques de REITMAN et FRANKEL (46) et de BABSON (163).

La sensibilisation d'une pellicule photographique permet aussi une appréciation semi-quantitative (52).

8.3.2.2. Choix de la méthode

Nous avons choisi l'acétate gélatineux d'après la technique de MANUCCI (286) comme support de la migration. Il a une moins grande affinité pour le révélateur que l'acétate de cellulose et la lecture des bandes est plus facile. DECKER et RAU (106) utilisent l'Azoène Fast Violet B comme révélateur de l'oxaloacétate formé au contact du substrat. Des essais par élution des bandes non révélées et dosage spectrophotométrique de l'activité enzymatique n'ont pas mis en évidence d'avantages appréciables : la sensibilité n'est pas plus grande par rapport à la méthode colorimétrique. Cette technique présente en outre l'inconvénient d'une manipulation délicate sans contrôle visuel de la bonne séparation. Nous avons donc préféré la méthode colorimétrique de révélation.

8.3.2.3. Méthode utilisée

Réactifs

- I.- Tampon phosphate monopotassique 40 mM pH 7,6
- II.- Acide aspartique 200 μ M/ml
Ajuster à pH 7,4 avec de la potasse 10 N
Congeler par fractions
- III.- Acide 2-oxo glutarique 100 μ M/ml
Ajuster à pH 7,6 avec de la potasse 2 N
Congeler par fractions
- IV.- Solution colorante d'Azoène Fast Violet B
75 mg dans 3,4 ml d'eau distillée
Mélange extemporané
Conserver à l'obscurité
- V.- Phosphate de pyridoxal à 500 μ g/ml
- VI.- Formaldéhyde à 5 %
- VII.- Solution d'albumine bovine à 1 %

Matériel

- . Cuves CHEMETRON
- . Bandes de Cellogel
- . Générateur SEBIA GD 500
- . Densitomètre enregistreur TLD 100 VITATRON
- . Etuve à 37°

Mode opératoire

- . Sécher les bandes de Cellogel sortant du méthanol à 40 % entre deux feuilles de papier filtre
- . Laisser 15 mm dans le tampon de migration

Migration

La migration s'effectue à 180 volts pendant deux heures et à +4°C. Nous couvrons la cuve avec une feuille de papier filtre pour éviter que l'eau de condensation ne retombe sur les bandes.

Révélation pour 5 bandes

- . Tampon phosphate monopotassique 40 mM pH 7,4 15 ml
- . Aspartate de potassium (Réactif II) 3,4 ml
- . Acide 2-oxoglutarique (Réactif III) 1,4 ml
- . Phosphate de pyridoxal (Réactif V) 0,4 ml
- . Albumine bovine (Réactif VII) 0,5 ml

Incuber ce mélange 10 mn à 37°

Ajouter 3,4 ml d'Azoène Fast Violet B (Réactif IV) et verser rapidement sur les bandes.

Laisser la coloration se développer pendant 4 mn environ à 37° (surveiller la réaction).

Fixation et conservation

Les bandes sont plongées dans deux bains successifs de réactif VI. Elles peuvent être alors conservées 24 à 48 heures dans un bain d'eau distillée à 4°C.

Lecture

Les lectures densitométriques sont effectuées à 485 nm. La surface des deux pics est évaluée par intégration ou par pesée. La limite inférieure de sensibilité de la méthode est de 150 mU/ml.

8.3.2.4. Résultats

L'électrophorèse révèle une bande importante entre les α_2 et les β globulines correspondant à l'isoenzyme cytoplasmique et une autre moins intense au niveau des γ globulines correspondant à l'isoenzyme mitochondriale. L'identité de chaque bande est confirmée en déposant un culot de mitochondries et le surnageant de l'homogénat après ultracentrifugation (figure 19). A l'enregistrement, la coloration du support rend difficile l'utilisation du système d'intégration (figure 20).

L'erreur relative moyenne calculée à partir de cinquante électrophorèses d'un même homogénat tissulaire est de 10 %. La reproductibilité est donc proche de celle d'un protéogramme. L'erreur relative moyenne sur les lectures est de 5 %.

La séparation des isoenzymes de la GOT par électrophorèse demande beaucoup de précautions, en particulier pendant la révélation. Sa reproductibilité étant médiocre, nous avons effectué chaque essai en double. Les électrophorèses sont lues deux fois.

8.3.3. Précipitation isoélectrique et dialyse

Le sulfate d'ammonium, dans les limites de concentration stricte, précipite d'abord l'enzyme cytoplasmique, puis l'enzyme mitochondriale.

La précipitation de l'enzyme cytoplasmique a lieu entre 50 et 67 % de saturation alors qu'elle atteint 60 à 85 % pour l'enzyme mitochondriale (39, 54, 55, 223, 224, 285, 292, 313, 340, 403).

L'extrait doit être purifié par dialyse (39, 55, 149, 223, 224, 285, 292, 298, 313, 403, 412, 415, 416), ou déssalage sur colonne de gel de dextrane type Sephadex.

Nous n'avons pas utilisé cette méthode pour purifier nos extraits. Son emploi ne se justifie que dans les cas où une quantité importante d'enzyme doit être purifiée. Les pertes au cours des manipulations sont, en effet, très importantes.

Par contre, nous avons dialysé les fractions contenant l'isoenzyme cytoplasmique après chromatographie sur colonne pour éliminer les ions en excès. La dialyse est effectuée contre du tampon phosphate 8 mM, une nuit à +4°C.

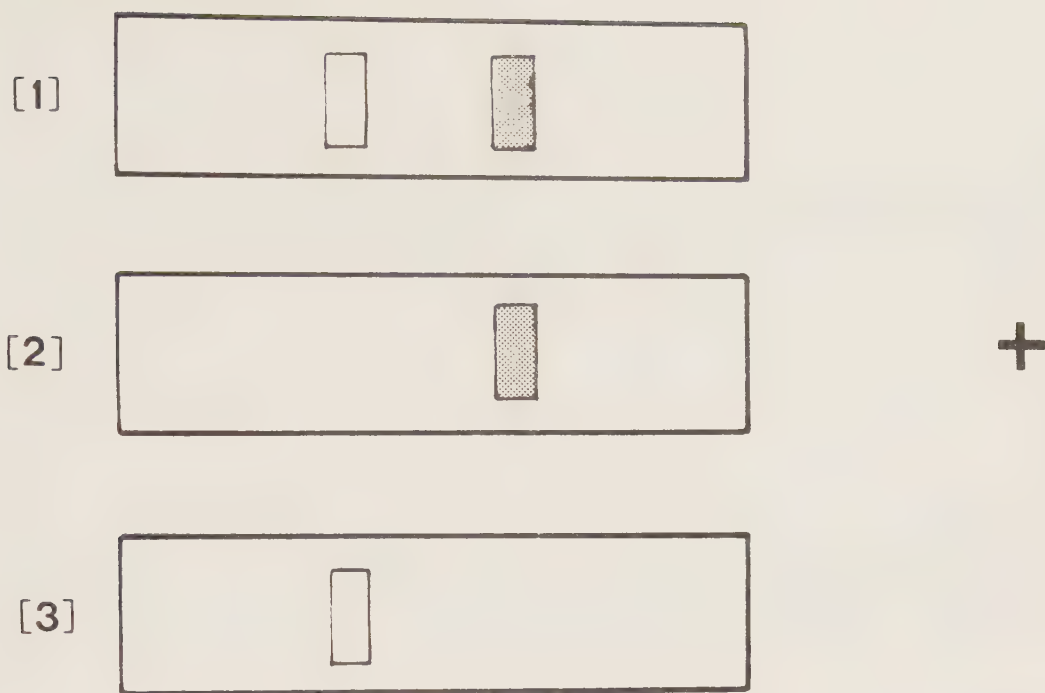


Figure 19 : Séparation électrophorétique des deux isoenzymes de l'aspartate aminotransférase

- (1) à partir d'un homogénat de foie de rat
- (2) à partir de la "phase soluble" après ultracentrifugation
- (3) à partir du culot de mitochondries

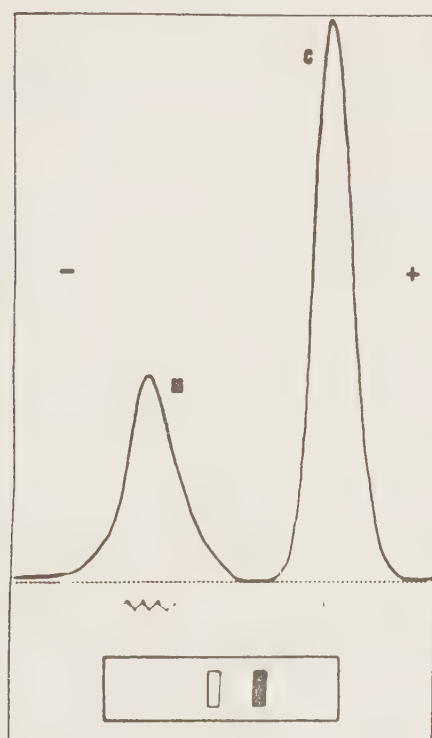


Figure 20 : Enregistrement d'une électrophorèse de GOT effectuée sur un homogénat de foie de rat

M : isoenzyme mitochondriale
C : isoenzyme cytoplasmique

CHAPITRE IX

VARIATIONS DE LA L-ASPARTATE:2.OXO-GLUTARATE AMINO.TRANSFERASE GLOBULAIRE,
TISSULAIRE ET PLASMATIQUE

De nombreux résultats sont erronés dans la littérature car les auteurs n'ont pas tenu compte des variations physiologiques et d'environnement. Les activités, les concentrations et la répartition des formes moléculaires multiples de la GOT peuvent changer sous l'influence de ces conditions d'environnement.

Avant d'étudier les variations pathologiques (diabète) ou dues à des médicaments tels que les biguanides, il est nécessaire de bien définir les valeurs de référence :

- . Chez l'homme, et tout d'abord dans les globules rouges qui constituent un tissu facilement accessible
- . Dans les tissus
- . Ensuite dans le plasma qui peut déjà donner des renseignements intéressants sur les taux tissulaires des enzymes.

En effet, au Centre de Médecine Préventive, les 40 000 résultats actuels nous permettent d'apporter quelques précisions sur les variations de l'activité de la GOT chez l'homme en fonction de l'âge, du sexe et de l'état nutritionnel.

Les valeurs de référence tissulaires ont été définies chez le rat parce que les prélèvements d'organes chez l'homme sain sont exceptionnels.

Par contre, les valeurs de référence des globules rouges et du plasma ont pu être établies directement chez l'homme.

Grâce au concours du Service de Diabétologie (Professeur DEBRY) et à la collaboration des biologistes de la région, nous avons pu doser la GOT chez des sujets diabétiques ou prédiabétiques.

9.1. VARIATIONS DE LA L-ASPARTATE, 2-OXOGLUTARATE AMINOTRANSFERASE DANS LES ERYTHROCYTES

La plupart des enzymes globulaires interviennent dans les fonctions de survie de l'hématie dont le métabolisme est restreint :

- . à la glycolyse anaérobie
- . et à la voie aérobie des hexoses monophosphates

La GOT est l'une des enzymes résiduelles de la différenciation du proérythroblaste en érythrocyte (20,479). Cette maturation s'accompagne d'une chute de l'activité enzymatique (221,255,316) parallèle à une disparition progressive de l'équipement mitochondrial. Seule, l'isoenzyme cytoplasmique subsiste dans l'hématie mature (286).

L'intérêt de la mesure de l'activité de la GOT dans les érythrocytes a été mis en évidence au cours des déficits en vitamine B₆. Ces derniers entraînent une activité plus faible de l'enzyme. Ils peuvent avoir pour origine :

- . la malnutrition (255,286)
- . la prise de médicaments : isoniazide (316), antiépileptiques (373), anticonceptionnels (391)
- . le vieillissement : l'activité est plus faible chez les sujets au-delà de 60 ans (221, 482)
- . certains états pathologiques tels que l'épilepsie (373)

Dans tous ces cas, la réponse à la saturation in vivo et in vitro, par le phosphate de pyridoxal est supérieure à celle observée chez les sujets normaux.

C'est dans cette perspective que nous avons voulu déterminer les valeurs de référence de la GOT érythrocytaire pour une population mixte âgée de 20 à 40 ans et l'influence de la prise d'un repas standard sur l'activité enzymatique.

Nous avons ensuite comparé ces valeurs à celles obtenues chez une population de diabétiques.

9.1.1. Valeurs de référence

Nous avons établi la distribution de la GOT érythrocytaire dans une population de sujets supposés sains, de 20 à 40 ans et à jeûn.

9.1.1.1. Distribution

Nous avons réalisé deux histogrammes, l'un sur une population de 168 hommes, l'autre sur 154 femmes (figures 21 et 22). Dans les deux cas, la distribution ne suit pas parfaitement la loi de Gauss.

Cependant la valeur moyenne calculée sur l'ensemble de la population est très proche de la médiane.

	HOMMES	FEMMES
Moyenne (mU/g d'hémoglobine)	4302,4	4498,7
Médiane (mU/g d'hémoglobine)	4254,5	4426,0

Certaines classes présentent des anomalies probablement dues à la petite taille de l'échantillon. On peut constater la grande dispersion des résultats obtenus, déjà signalée par plusieurs auteurs (143, 286, 482).

9.1.1.2. Répartition selon le sexe

La distribution des valeurs n'étant pas gaussienne, nous présentons les valeurs obtenues pour 5-50 et 95 % de la population.

Les fourchettes à 5 et 95 % sont comprises entre 2200 et 6600 mU/g d'hémoglobine chez les hommes et entre 2200 et 7200 mU/g d'hémoglobine chez les femmes.

Les valeurs sont légèrement plus élevées chez la femme puisque la médiane est de 4426 mU/g d'hémoglobine chez les femmes et 4254 mU/g d'hémoglobine chez les hommes.

9.1.1.3. Influence de la prise d'un repas standard sur l'activité enzymatique

Nous comparons les moyennes des activités enzymatiques à jeûn et après un repas standard chez les mêmes sujets (tableau 27).

TABLEAU XXVII : ACTIVITE DE LA GOT DANS LES ERYTHROCYTES CHEZ LES MEMES SUJETS A JEUN ET APRES UN REPAS STANDARD

ACTIVITE EN mU/g D'HEMOGLOBINE/ml		n	$\bar{m}$	s	CV
HOMMES (20-40 ans)	A JEUN	86	3966	1421	35,8
	APRES REPAS	86	4111	1398	34,0
FEMMES (20-40 ans)	A JEUN	67	4087	1318	32,2
	APRES REPAS	67	4256	1345	31,6

Les différences observées sont minimales et ne sont pas statistiquement significatives.

9.1.1.4. Corrélation entre la GOT érythrocytaire et la GOT plasmatique

Les valeurs de la GOT plasmatique et globulaire sont indépendantes ($r = 0,03$).

Ce même résultat a été publié par KARMEN et WROBLEWSKI (233). Il nous semble intéressant, puisqu'il permet d'envisager des applications différentes pour l'enzyme sérique et pour l'enzyme érythrocytaire.

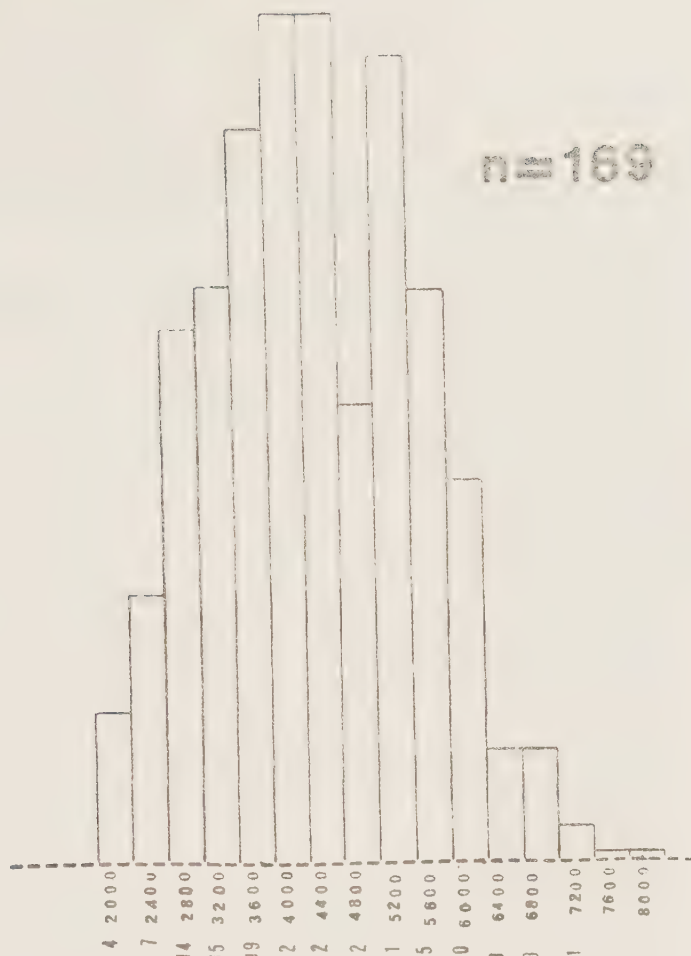


Figure 21 : Activité de la GOT érythrocytaire chez l'homme. Histogramme obtenu dans une population de sujets sains de 20 à 40 ans.

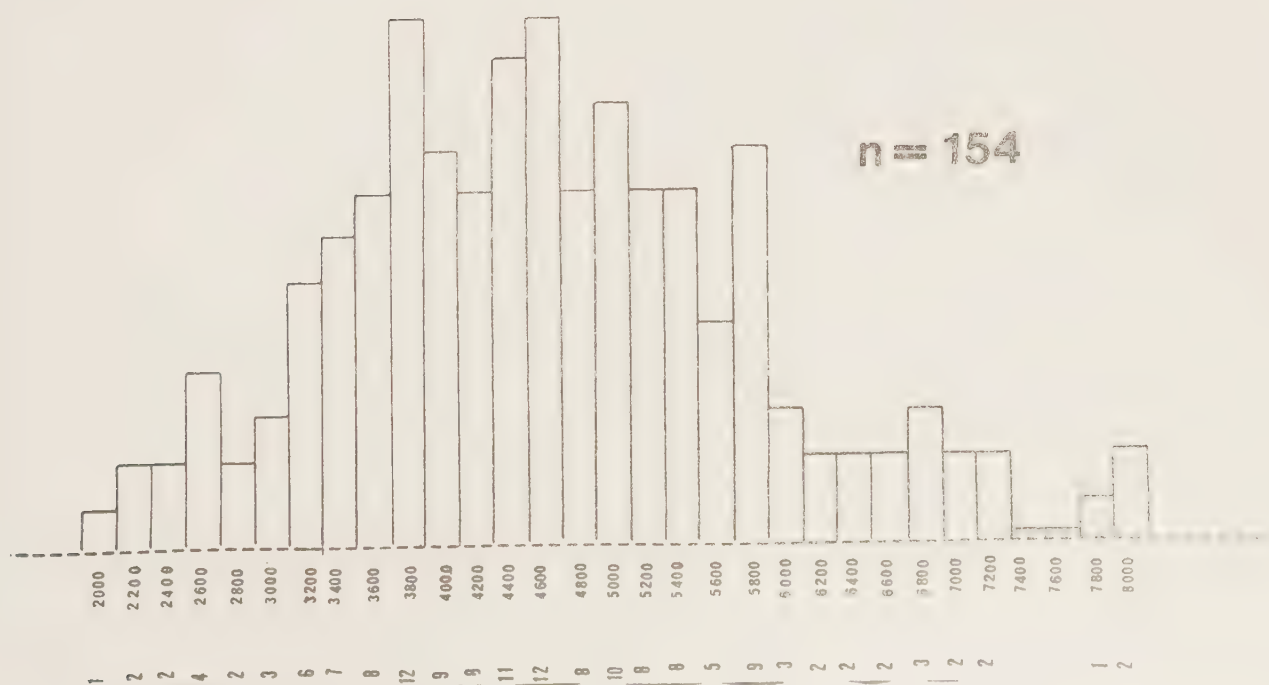


Figure 22 : Activité de la GOT érythrocytaire chez la femme. Histogramme obtenu dans une population de sujets sains de 20 à 40 ans.

9.1.2. Valeurs obtenues chez des sujets diabétiques ou prédiabétiques

Nous avons dosé la GOT chez 25 sujets diabétiques ou prédiabétiques hospitalisés au Service de Diabétologie.

La moyenne obtenue sur l'ensemble des sujets est de 6231 mU/g d'hémoglobine et les fourchettes ($\bar{m} + 2s$) sont comprises entre 1547,8 mU et 10915,4 mU/g d'hémoglobine. Elle est donc nettement supérieure aux valeurs de référence établies sur une population d'hommes et de femmes de 20 à 40 ans (figures 21 et 22).

L'âge des malades varie de 20 à 76 ans mais 84 % d'entre eux sont âgés de plus de 40 ans. VON HAUGH (482) et JACOBS (221) constatent une baisse de l'activité de la GOT en fonction de l'âge. Ces observations confirment donc l'augmentation de la GOT érythrocytaire chez les diabétiques.

La moyenne est plus élevée chez les hommes que chez les femmes mais le nombre d'échantillons dans chaque groupe est différent. En effet, les mesures ont été effectuées chez 8 femmes seulement et 17 hommes.

La moyenne chez les hommes est de 6839,2 mU/g d'hémoglobine. Elle est donc supérieure à celle de notre population de référence de 20 à 40 ans (figure 23).

La valeur moyenne obtenue chez les femmes diabétiques est de 4940,5 mU/g d'hémoglobine (figure 24). Elle est légèrement supérieure à celle de la population de référence du même sexe.

Ces premiers résultats bien que fragmentaires, nous montrent une augmentation de la GOT érythrocytaire au cours du diabète traité soit par

- l'insuline
- les sulfamides hypoglycémiants
- les biguanides hypoglycémiants
- un traitement mixte...

Cette augmentation est due probablement à la concentration élevée des acides aminés sanguins chez le sujet diabétique.

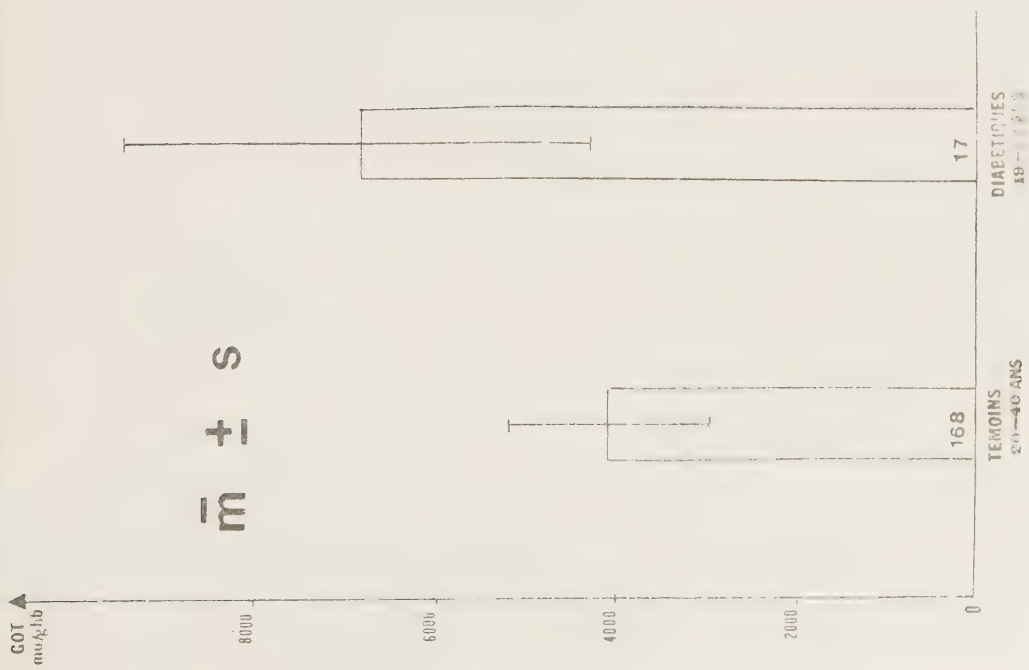


Figure 23 : GOT érythrocytaire. Valeurs obtenues chez les hommes diabétiques.

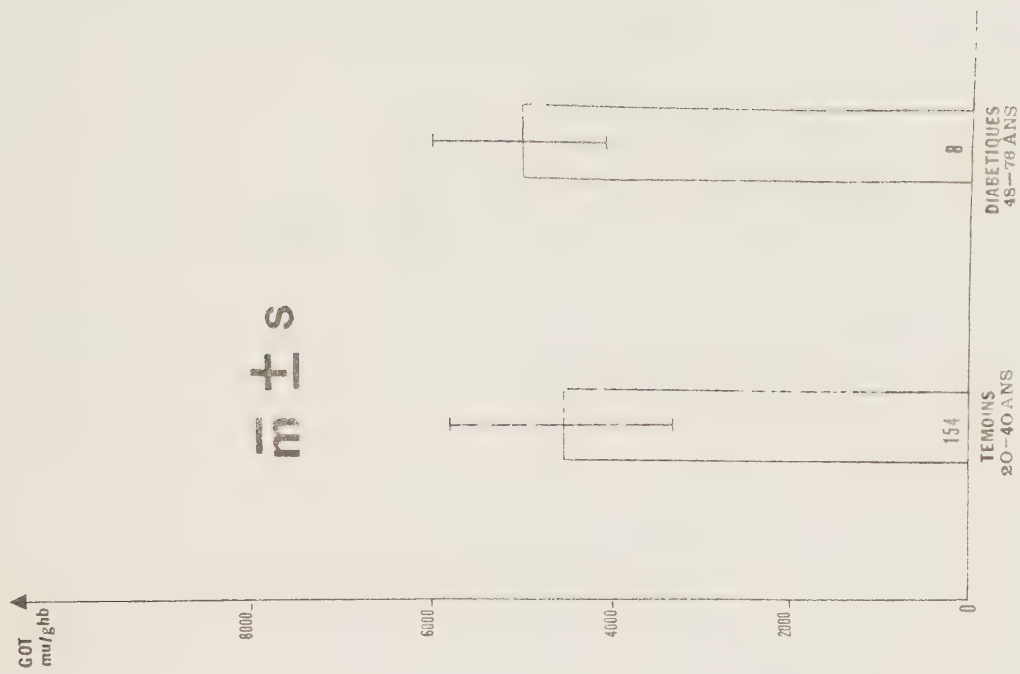


Figure 24 : GOT érythrocytaire. Valeurs obtenues chez les femmes diabétiques.

9.2. VARIATIONS DE LA L-ASPARTATE:2-OXOGLUTARATE AMINOTRANSFERASE TISSULAIRE ----- ET PLASMATIQUE -----

La grande dispersion des résultats observés à l'échelon individuel et plus encore interindividuel a pour origine les variations physiologiques et celles dues à l'environnement.

C'est ce que peut mettre en évidence l'étude des variations de la GOT plasmatique et tissulaire.

9.2.1. Dans les tissus

Les variations du métabolisme au niveau d'un organe entraînent une adaptation de l'activité des enzymes tissulaires. Il est donc important de connaître :

- les facteurs de stimulation
- les limites physiologiques de l'adaptation

La définition des valeurs normales des enzymes dans chaque tissu en fonction des conditions d'environnement permettrait de prévoir, de façon plus précoce, les déviations pathologiques qui se traduisent par une libération massive d'enzyme dans le plasma.

Les variations physiologiques des enzymes tissulaires ne sont pas encore connues avec précision chez l'animal. Chez l'homme, cette étude fait l'objet de travaux très rares car la pratique des ponctions biopsies d'organes n'est effectuée que dans les cas pathologiques.

9.2.1.1. Influence du sexe

Les variations en fonction du sexe sont faibles (49). On observe cependant une augmentation plus forte de l'enzyme hépatique chez les rates au cours du jeûne (243).

9.2.1.2. Influence de l'âge

Dans le foie de rat, l'augmentation de l'activité de la GOT est progressive depuis la naissance jusqu'à la puberté de l'animal qui est marquée par une légère chute du niveau enzymatique. Pendant la maturité, l'activité de la GOT se stabilise pour s'élever faiblement chez les rats de 10 à 11 semaines (49, 243, 399, 465, 508).

L'augmentation de la GOT hépatique à la naissance, est due à une activité plus élevée de l'isoenzyme cytoplasmique. L'isoenzyme mitochondriale ne varie pas.

L'amplitude de l'augmentation varie selon les animaux. Ainsi l'augmentation est plus faible chez le cobaye et YEUNG et OLIVER (508) attribuent ces variations à la maturité différente des animaux à la naissance. En effet, TORDET-CARIDROIT (465) constate une hypoglycémie chez les rats nouveaux-nés ayant subi un retard de croissance intra-utérine. Elle est suivie d'une augmentation plus faible de la GOT par rapport à celle des témoins. Dès à présent, nous pouvons insister sur le rôle des hormones que nous développerons dans le paragraphe 9.2.1.6.

L'activité de la GOT hépatique est liée au développement du foie. SATO (400) a mis en évidence un "vieillissement du foie chez l'homme" entre 14 et 96 ans. Il se traduit par une chute du poids du foie. Le nombre d'hépatocytes diminue, le volume du noyau des cellules est plus grand et le nombre d'hépatocytes binucléés augmente. La vitesse d'apparition de ces signes varie selon la race et le lieu géographique. Les Japonais semblent "vieillir" plus rapidement que les Blancs.

Dans le coeur, les deux isoenzymes, mitochondriale et cytoplasmique, augmentent régulièrement pendant la croissance, quatre jours après la naissance (203).

Dans le cerveau, cette augmentation n'apparaît que 12 jours après la naissance. Elle correspond à une activité accrue de l'isoenzyme cytoplasmique (497).

9.2.1.3. Influence du froid

Le catabolisme protéique est accéléré pendant un séjour au froid. En effet, l'activité hépatique de la transaminase augmente avec une élimination parallèle d'azote urinaire et une chute de poids. Cette augmentation est indépendante de la sécrétion des corticoïdes induits par le stress dû au froid ainsi que d'une prise plus grande de nourriture (243). Notons cependant une augmentation de la taille du foie (165).

L'adaptation au froid se traduit par une diminution de la masse musculaire et une augmentation de la vascularisation (165,202). Le contenu enzymatique du muscle est plus faible chez l'animal adapté au froid pendant un effort d'une durée inférieure à 3 heures (111,165). La résistance musculaire est donc fonction de la température.

9.2.1.4. Influence du rythme circadien et des variations saisonnières

L'activité maximum de l'enzyme hépatique du poulet se situe à 24 h, son minimum à 18 h (247,248). Ce rythme journalier est compris dans un rythme saisonnier (49) dont le pic maximum apparaît en été pendant lequel l'état catabolique de l'organisme est prédominant (278).

9.2.1.5. Influence des vitamines

L'activité de la GOT hépatique (243) est plus faible lorsque l'apport en vitamine B₆ est réduit.

La vitamine E stabilise la membrane cellulaire et une carence entraîne une activité transaminasique plus élevée dans le sérum par dégénérescence de la membrane plasmatique de l'hépatocyte (367). Cette carence est en relation avec un taux en ATPase et 5'nucléotidase cellulaire plus faibles (283).

9.2.1.6. Influence des hormones

L'activité de la GOT hépatique augmente après une injection de corticoïdes ou d'ACTH (59,196,243,408).

Lorsque la cortisone est administrée régulièrement à des rats pendant 6 jours, à raison de 12 mg par jour, l'activité de la GOT dans le foie est doublée. L'activité spécifique de l'isoenzyme cytoplasmique correspond à 300 % de sa valeur initiale alors que celle de l'isoenzyme mitochondriale montre peu de changements (142). La cortisone provoque donc une induction plus importante de la GOT I.

L'action de l'ACTH est moins forte que celle de la cortisone et une adrénalectomie modifie peu l'activité de la GOT (398,408).

Le cortisol, la thyroxine, l'hormone somatotrope et l'oestradiol n'ont pas d'effet sur le niveau de la GOT hépatique (153, 203, 408).

L'action de la testostérone varie avec l'animal utilisé. Ainsi, l'activité de la GOT hépatique chez la souris et le cobaye ne varie pas après injection de testostérone (243, 244). Par contre, elle augmente chez le rat (244).

L'action de l'insuline et de l'hydrocortisone est liée à celle de la testostérone.

En effet, POLIKARPOVA (366) n'observe une induction de la GOT dans le foie par l'hydrocortisone que chez des rats immatures.

L'insuline inhibe cette induction. Chez le rat adulte par contre, l'insuline potentialise la synthèse de la GOT alors que l'action de l'hydrocortisone est beaucoup plus faible.

Après injection de gonadotrophines, le niveau de la GOT augmente dans les ovaires mais pas dans l'utérus. Cet effet est contraire à celui des oestrogènes qui n'affectent pas l'activité de l'enzyme dans les ovaires alors qu'ils l'augmentent dans l'utérus. Il faut remarquer une augmentation parallèle du poids de l'ovaire et de l'utérus (243).

La GOT musculaire enfin, est plus élevée après injection d'androgènes (243).

9.2.1.7. Variations au cours du cycle menstruel

L'étude de HOCHMAN (207) est réalisée sur des prélèvements de l'endomètre chez six femmes seulement. La GOT augmente dans ce tissu jusqu'au 14^e jour du cycle puis décroît pour être minimum pendant les menstruations. Malgré le petit nombre d'échantillons et les variations interindividuelles, il apparaît une relation avec le niveau des oestrogènes.

9.2.1.8. Influence de l'effort

Chez le rat, le contenu en GOT dans le muscle rouge au repos est supérieur à celui du muscle blanc (111). Il correspond à un nombre de capillaires sanguins plus élevé dans le muscle rouge (202). Ces différences peuvent expliquer l'augmentation plus importante du niveau de la GOT dans le muscle rouge après un effort, par rapport à celle observée dans le muscle blanc (111).

9.2.1.9. Influence de l'anoxie

La sortie de l'enzyme musculaire apparaît lorsque l'animal est maintenu dans une atmosphère comprenant 7 % d'oxygène (205, 310). LANGSLET (252) constate un ralentissement de la sortie de la GOT dû à une stabilisation par les phénothiazines de la membrane des cellules du muscle cardiaque en hypoxie.

9.2.1.10. Influence de la nutrition

La GOT est un indice du catabolisme protidique et de la néoglucogénèse (59, 73, 240). Elle est induite dans le foie après administration d'un régime hyperprotidique (153, 243, 260). L'amplitude des variations est parallèle à la teneur en protéines jusqu'à 75 à 90 % en protéines, puis l'augmentation de la GOT est minime (153, 486).

Ainsi l'activité de la GOT dans le foie de rats nourris avec un régime comprenant 80 % de carence représente 180% de la valeur du témoin.

Elle n'est pas influencée par un régime hypocalorique si l'apport protéique est suffisant et si la composition des aliments en acides aminés est équilibrée (486).

Son activité diminue lorsque l'apport alimentaire est pauvre en protéines. Elle est augmentée lorsque le régime n'a pas une composition équilibrée en acides aminés. Au cours d'un jeûne de 5 jours, par exemple, l'augmentation de la GOT est voisine de 100 % (243).

L'augmentation de la GOT est indépendante de la valeur nutritionnelle des différentes préparations protéiques (35).

L'adaptation à des régimes pauvres en glucides se manifeste en premier lieu par une augmentation de l'activité de la glucose-6-phosphatase suivie d'une activité plus élevée de la GOT. L'utilisation des acides aminés comme source d'énergie permet d'"économiser" la voie énergétique de la glycolyse.

Par contre, la GOT hépatique est indifférente à des régimes hyperglucidiques et hyperlipidiques (486).

Si le régime ne contient pas les acides aminés essentiels et au cours d'un jeûne prolongé, l'activité de la GOT hépatique augmente avec une élimination accrue de l'azote urinaire et une chute de poids (241, 243, 398).

Le niveau de la GOT revient à la normale après réalimentation (398).

Nous avons également observé cette augmentation dans le foie de rats à jeûne 48 heures. Ces résultats seront présentés et discutés plus en détail dans la troisième partie de notre travail.

Nous avons signalé précédemment les variations du contenu enzymatique du foie, en fonction de l'âge, de la race, et de la répartition géographique. Il est possible que des états nutritionnels différents selon les populations puissent les expliquer (400).

9.2.1.11. Influence de l'environnement

L'activité de la GOT varie peu lorsque les animaux sont exposés au "smog". La transaminase est légèrement plus élevée dans les homogénats de rein et de poumon chez le lapin et le rat (246).

Un traitement par des radiations entraîne la chute de l'activité de l'enzyme dans le granulocyte avec une augmentation dans le lymphocyte (155). Une telle augmentation apparaît également dans le foie de rat alors que la GOT est abaissée dans l'intestin. Le retour à la normale des enzymes tissulaires a lieu seulement après 10 jours (59).

9.2.2. Dans le plasma

L'origine de la GOT dans le plasma de sujets sains fait encore l'objet d'hypothèses. A l'électrophorèse, une seule bande apparaît vers l'anode. Selon KOJ (245) cette enzyme d'origine cytoplasmique pourrait être libérée à partir des éléments figurés du sang, érythrocytes ou plaquettes. Il est connu en effet que des enzymes sortent de ces éléments en particulier des plaquettes ou bien sont consommées pendant la coagulation (242). Il est peu probable cependant que la GOT plasmatique soit due à une légère hémolyse car celle-ci ne modifie pas l'activité de l'enzyme jusqu'à 50 mg d'hémoglobine dans 100 ml de sérum ou de plasma (68, 200).

Pour la plupart des auteurs, le gradient de concentration élevé entre les deux compartiments, intracellulaire et plasmatique, suppose un passage de l'enzyme de l'un dans l'autre. Le mécanisme précis de la sortie des enzymes et leur dégradation dans le milieu extracellulaire ne sont pas encore connus. Toutefois les méthodes de perfusion de tissus entiers, les épreuves de surcharge in vivo ainsi que l'étude de cas pathologiques ont permis d'apporter quelques précisions sur ce problème.

L'apparition de la GOT dans le liquide de perfusion du foie a lieu 5 minutes seulement après le début de la perfusion (415, 416, 418). D'autre part, si un lobe du foie est isolé au moyen d'une ligature sans lésion tissulaire, l'activité de la GOT dans le sérum augmente brutalement lorsque la ligature est enlevée (142).

Dans des conditions physiologiques, on peut donc supposer une "clearance" cellulaire de la GOT.

Dans les cas de nécrose tissulaire, la vitesse de passage des iso-enzymes est fonction - de la gravité de l'atteinte
- de l'organe lésé
- de l'animal utilisé

Ainsi dans les cas d'infarctus, la P-GOT est augmentée 5 à 12 heures (259, 417) après l'accident alors qu'une injection de tétrachlorure de carbone provoque l'apparition de la GOT dans le sérum, 24 heures après l'injection chez le rat (125) et seulement 48 heures après chez le chien (146). La présence des deux isoenzymes dans le sérum indique que les cellules se sont vidées d'une partie de leur contenu cytoplasmique et mitochondrial, probablement par une altération de la structure de la membrane cellulaire (127, 146, 259, 417, 497). L'augmentation de l'activité de la GOT plasmatique est due principalement à une quantité plus importante de l'isoenzyme cytoplasmique.

Il semble donc que la sortie de la GOT soit conditionnée par sa localisation à l'intérieur de la cellule.

Le retour à la normale de la GOT plasmatique dépend de la vitesse d'inactivation de l'enzyme et de son élimination dans les autres liquides biologiques. Celles-ci sont encore mal connues.

Les travaux de FLEISCHER et WAKIM (149, 485) et de MASSARAT (304, 315) indiquent une élimination partielle dans le système réticulo endothélial, la bile et les urines de l'enzyme active ou partiellement inactivée au niveau rénal (204).

La vitesse d'inactivation est mesurée en injectant des doses connue d'enzyme ou des isoenzymes purifiées (142, 146, 149, 485). L'activité maximum apparaît dix minutes après l'injection intraveineuse. 97 % de l'isoenzyme I sont éliminés après 24 heures et le retour à la normale a lieu trois à six jours après (103, 146, 410, 497). La courbe de disparition de la GOT est de nature semi-logarithmique durant les premières heures après l'injection (103). La pente est variable selon l'animal.

L'isoenzyme II disparaît beaucoup plus rapidement. Chez le chien, la majorité est éliminée après deux heures et la totalité après cinq heures seulement (149).

Les variations physiologiques de la GOT plasmatique sont directement fonction de la connaissance des mécanismes de sortie de l'enzyme dans le milieu extracellulaire.

Cependant peu de travaux établissent une corrélation entre les valeurs tissulaires et plasmatiques chez l'homme sain parce que les prélèvements tissulaires sont rares.

Notre étude sur l'homme ne concerne également que les variations physiologiques de la GOT dans le plasma.

Notre premier objectif a donc été d'établir les corrélations des valeurs biologiques avec certains de ces facteurs : âge, sexe, poids, état nutritionnel, rythme circadien, pour faire diminuer les variations inter et intraindividuelles (89, 172, 193, 347, 498, 510).

Les valeurs usuelles de la GOT sont établies sur un grand nombre de sujets supposés sains dans les conditions les plus standardisées possible.

Elles sont très dispersées. D'autres auteurs ont également observé cette grande dispersion des résultats (26, 41, 377, 431, 491), répartis selon une distribution non gaussienne (89, 172, 193, 347, 498, 510) (figure 25). C'est pourquoi nous n'avons pas tracé la moyenne et les déviations standards, mais les valeurs trouvées pour 2,5- 50 et 97,5 % de la population.

9.2.2.1. Influence de l'heure du prélèvement

THOMSON (462) ne constate aucune variation quelle que soit l'heure du prélèvement. Nos résultats montrent également que les valeurs de la GOT plasmatique sont indépendantes de l'heure du prélèvement (figure 26) entre 13 h et 15 h.

9.2.2.2. Influence du sexe

La GOT plasmatique est plus élevée chez l'homme que chez la femme (26, 32, 172, 402, 462, 491).

Chez les enfants de moins de 6 ans, les valeurs sont identiques (481).

Nos moyennes sont de 28 mU/ml chez la femme et chez l'homme de 34 mU/ml (méthode MORGENSTERN sur SMA 12/60). (tableau 28). Il est possible que la masse musculaire soit à l'origine de cette différence.

9.2.2.3. Influence de l'âge

Elle est relativement peu importante (26, 41, 377, 431, 482, 491).

Nos résultats le confirment (tableau 28). Cependant la GOT est plus élevée chez les enfants de 6 ans et s'abaisse progressivement pour atteindre un minimum entre 15 et 20 ans. La moyenne se stabilise ensuite pour augmenter légèrement chez la femme au-delà de 50 ans.

Des résultats voisins ont été obtenus sur d'autres populations (34, 200, 481).

9.2.2.4. Influence de la prise de nourriture

Les valeurs usuelles en biologie sont établies classiquement chez des sujets à jeûn. Nous avons entrepris une étude sur l'influence de la prise d'un repas, sur l'activité de la GOT plasmatique. Sachant qu'un jeûne court les modifie peu (97), les valeurs obtenues chez des sujets à jeûn sont comparées à celles obtenues chez des sujets ayant pris :



Figure 25 : Histogramme de la P.GOT dans une population saine.

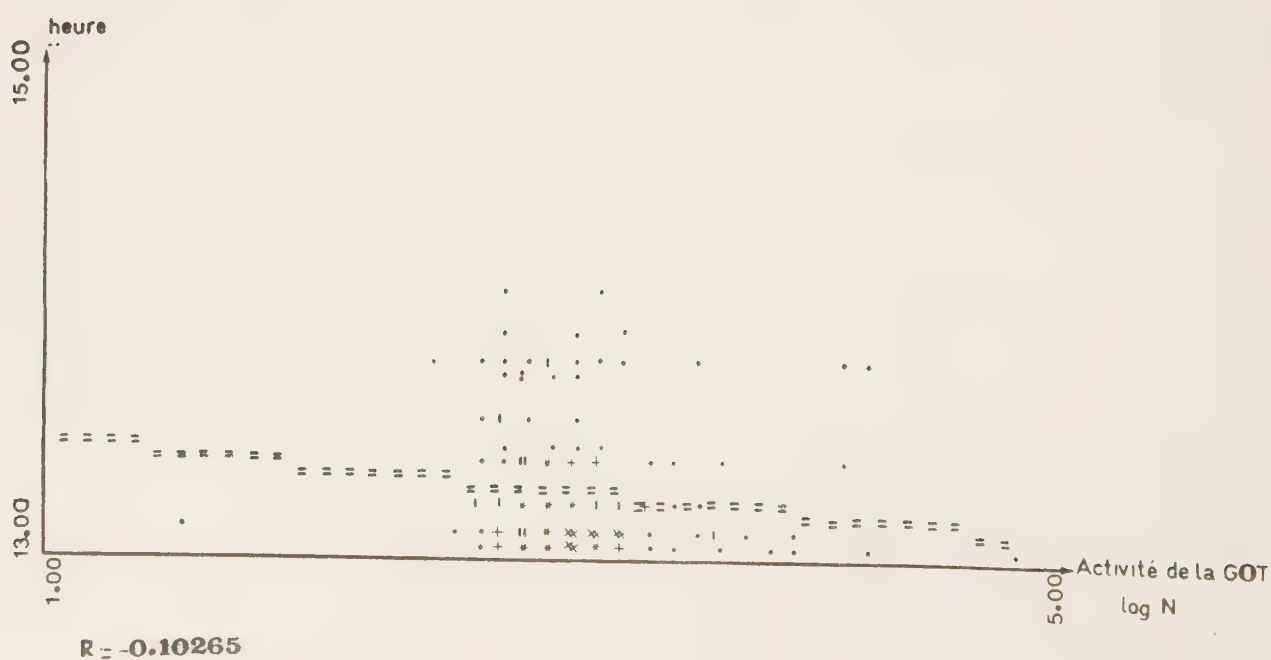


Figure 26 : Variations de la P.GOT en fonction de l'heure du prélèvement.

TABEAU XXVIII : VALEURS USUELLES DE LA P.GOT SELON L'AGE ET LE SEXE
CHEZ DES SUJETS A JEUN. INFLUENCE DE LA PRISE D'UN
REPAS DONT LA COMPOSITION N'EST PAS STANDARDISEE.
(Les chiffres présentés correspondent à la médiane avec,
entre parenthèses, les fourchettes à 2,5%)

AGE	HOMMES		FEMMES	
	A jeûn	Non à jeûn	A jeûn	Non à jeûn
6 - 10 ans	42,4 (26,3 - 64,3)	42,7 (27,9 - 62,8)	41,8 (26,3 - 59,9)	41,1 (26,4 - 59,9)
10 - 15 ans	38,6 (25,0 - 66,0)	38,0 (24,0 - 52,0)	34,7 (19,4 - 56,0)	33,3 (17,1 - 53,2)
15 - 20 ans	33,2 (20,7 - 54,0)	33,6 (20,3 - 56,1)	28,1 (16,4 - 44,9)	28,8 (16,7 - 43,0)
20 - 30 ans	33,5 (20,4 - 69,4)	32,4 (20,2 - 62,2)	28,2 (16,1 - 54,9)	28,1 (15,9 - 49,1)
30 - 40 ans	35,2 (20,2 - 78,8)	33,9 (20,2 - 72,8)	27,8 (25,8 - 51,8)	27,7 (19,1 - 47,1)
40 - 50 ans	36,0 (20,8 - 81,9)	34,3 (20,2 - 74,9)	28,3 (16,2 - 55,6)	28,0 (16,1 - 51,1)
50 - 60 ans	34,8 (20,4 - 80,6)	34,7 (19,4 - 77,6)	31,3 (17,6 - 61,4)	32,1 (17,2 - 56,1)
> 60 ans	34,3 (20,9 - 74,5)	34,7 (20,6 - 68,1)	32,5 (20,4 - 61,5)	32,1 (19,1 - 55,1)

- . soit un repas dont l'heure et la composition sont variables
- . soit après un repas standard de 800 calories pris deux heures avant le prélèvement.

Nous avons éliminé les valeurs aberrantes ou très élevées.

1. Repas dont l'heure et la composition sont variables

Les valeurs de la GOT sont généralement plus élevées après un repas (tableau 28) mais les différences ne sont pas statistiquement significatives sauf chez la femme entre 50 et 60 ans ($P \leq 0,01$).

Remarquons cependant une valeur plus faible de la GOT après un repas chez l'homme entre 30 et 50 ans ($P \leq 0,01$).

Les résultats sont un peu plus dispersés après un repas.

2. Repas standard

Les valeurs sont généralement plus élevées par rapport à celles obtenues chez les sujets à jeûn. Toutefois ces différences ne sont pas statistiquement significatives ($P \leq 0,01$) sauf chez les hommes de 6 à 10 ans et 20 à 30 ans et chez les femmes de 20 à 60 ans (tableau 29).

L'activité de la GOT plasmatique dans des conditions standardisées est supérieure à celle obtenue pour une population ayant pris un repas dont l'heure et la composition varient.

Les différences sont très nettes ($P \leq 0,01$) chez les hommes et chez les femmes de 6 à 10 ans et de 20 à 50 ans (tableau 29).

La standardisation de la prise de nourriture et de l'heure du prélèvement fait donc apparaître une adaptation différente de la GOT plasmatique à la prise de nourriture, selon l'âge et le sexe des individus.

Il est probable qu'elle soit due à des états nutritionnels variables que nous pourrions définir grâce à un questionnaire sur l'alimentation habituelle du sujet.

Ce travail est actuellement en cours.

TABLEAU XXIX : VALEURS USUELLES DE LA P.GOT SELON L'AGE ET LE SEXE
 DEUX HEURES APRES LA PRISE D'UN REPAS STANDARD.
 (Les chiffres présentés correspondent à la médiane avec,
 entre parenthèses, les fourchettes à 2,5%)

AGE	H O M M E S	F E M M E S
	Non à jeûn	Non à jeûn
6 - 10 ans	44,3 (31,5 - 64,1)	42,2 (27,6 - 60,0)
10 - 15 ans	37,9 (26,4 - 59,9)	35,2 (23,0 - 52,4)
15 - 20 ans	33,1 (22,1 - 55,4)	28,1 (20,1 - 51,6)
20 - 30 ans	35,4 (21,6 - 72,2)	29,7 (19,6 - 53,4)
30 - 40 ans	36,9 (21,7 - 68,1)	30,3 (20,1 - 51,9)
40 - 50 ans	38,9 (21,6 - 83,9)	29,4 (20,3 - 58,0)
50 - 60 ans	35,9 (21,2 - 81,4)	34,4 (21,3 - 63,2)
> 60 ans	35,5 (25,5 - 75,1)	33,7 (21,7 - 51,5)

9.2.2.5. Influence de l'effort

Chez l'homme entraîné ou non, une épreuve d'effort se traduit le plus souvent par une augmentation de la GOT sérique ou plasmatique. Cependant certains auteurs (4, 165) n'ont observé aucune variation et d'autres même une diminution de cette même enzyme. Les résultats sont difficilement interprétables, les sujets étant plus ou moins entraînés et les épreuves d'effort étant très différentes les unes des autres.

Chez l'animal, qu'il soit entraîné ou non, quel que soit le type ou la durée de l'effort appliqué, la GOT plasmatique augmente. Cependant il est à noter que l'effort appliqué est toujours intense (165).

9.2.2.6. Variations selon les catégories socio-professionnelles

Nous avons comparé les valeurs de la GOT plasmatique sur différentes catégories socio-professionnelles donc d'activité différente.

Nous avons utilisé les codes suivants (selon la quatrième édition de 1962 du code des catégories socio-professionnelles de l'INSEE) :

Code 1 : salariés agricoles

Code 3 : professions libérales et cadres supérieurs

Code 4 : cadres moyens (instituteurs, services techniques...)

Code 5 : employés de bureau, employés de commerce

Nos résultats sont regroupés selon l'âge et le sexe des sujets (tableaux 30 et 31).

Les calculs statistiques n'ont été effectués que lorsque le nombre d'individus était suffisant ($n \geq 30$).

Les résultats les plus élevés sont observés chez les salariés agricoles et les employés de bureau ou employés de commerce, hommes ou femmes. Il faut souligner cependant le petit nombre de résultats correspondant au code 1.

Par ordre d'activité croissante, nous pouvons classer ensuite les professions correspondant au code 3, puis au code 4.

Les différences sont moins grandes chez les hommes que chez les femmes.

Les variations observées ne peuvent être attribuées uniquement à l'activité des sujets. Un état nutritionnel différent selon les sujets pourrait expliquer également ces différences.

TABLEAU XXX : P.GOT : VALEURS OBSERVEES SELON LES GROUPES SOCIO-PROFESSIONNELS CHEZ L'HOMME.
 (Les chiffres présentés correspondent à la médiane avec, entre parenthèses, les fourchettes à 2,5%)

AGE	CODE 1		CODE 3		CODE		CODE 5	
	n		n		n		n	
20 - 30 ans	n = 13	37,5 (20,8 - 53,8)	n = 421	32,3 (18,9 - 60,6)	n = 393	32,7 (20,7 - 61,2)	n = 371	34,7 (20,5 - 64,5)
30 - 40 ans	n = 47	38,6 (20,5 - 72,3)	n = 445	32,6 (18,8 - 66,9)	n = 483	34,7 (20,4 - 67,4)	n = 414	37,6 (20,6 - 82,7)
40 - 50 ans	n = 47	38,8 (22,9 - 89,6)	n = 384	33,3 (19,3 - 60,7)	n = 404	34,6 (21,2 - 71,9)	n = 330	37,7 (21,3 - 82,8)
50 - 60 ans	n = 44	36,7 (20,2 - 79,5)	n = 238	34,5 (19,0 - 67,7)	n = 244	34,7 (20,1 - 70,9)	n = 201	37,7 (20,5 - 82,8)
60 - 70 ans	n = 32	41,1 (26,3 - 63,0)	n = 115	33,2 (21,5 - 76,5)	n = 98	33,5 (21,2 - 62,4)	n = 117	37,7 (20,5 - 82,8)
70 - 80 ans			n = 24	33,4 (18,0 - 62,0)	n = 21	35, (21,4 - 57,4)	n = 24	37,7 (25,5 - 82,8)

Ces premiers résultats sur les variations physiologiques de la GOT devront être poursuivis par des études complémentaires sur l'influence d'autres facteurs en particulier, le cycle menstruel, la grossesse, les vitamines, les médicaments, l'environnement. Quelques observations ont déjà été relevées dans la littérature.

9.2.2.7. Variations au cours de la grossesse

La transaminasémie ne varie pas au cours d'une grossesse normale (11).

9.2.2.8. Influence des vitamines

Les études portent essentiellement sur les vitamines au cours des déficits en vitamine B₆, coenzyme des transaminases (221, 264).

La désaturation de l'apoenzyme en coenzyme serait due :

- . soit à une quantité plus faible de vitamine B₆ circulante (221)
- . soit à une libération massive de l'apoenzyme dans le plasma (264).

Elle est observée au cours du vieillissement (221, 369) et dans les états de malnutrition (221), mais également dans les cas pathologiques avec un niveau de transaminase plasmatique élevé (200, 264).

La réponse à une stimulation in vivo et in vitro par le phosphate de pyridoxal est plus forte chez les sujets carencés ou âgés, mais aussi dans les hypertransaminasémies. Ce test de stimulation serait un meilleur indice du degré de carence vitaminique que l'activité globale de la GOT.

9.2.2.9. Influence des médicaments

Certains médicaments tels que la chlorpromazine, l'éthionamide, les contraceptifs, les anabolisants, les antibiotiques, la méthyldopa, la noradrénaline, les opiacés, les salicylés, la pyridoxine, les barbituriques (68, 114, 199, 263, 342, 413, 437) provoquent une augmentation de la GOT plasmatique, au cours de traitements prolongés, par hépatotoxicité. L'isoniazide (316) entre en compétition avec le coenzyme et entraîne une chute de l'activité enzymatique.

TABLEAU XXXI : P.GOT : VALEURS OBSERVEES SELON LES GROUPE S SOCIO-PROFESSIONNELS CHEZ LA FEMME.

(Les chiffres présentés correspondent à la médiane avec, entre parenthèses, les fourchettes à 2,5%)

AGE	CODE 1		CODE 3		CODE 4		CODE 5	
	n		n		n		n	
20 - 30 ans	3	32,5 (25,4 - 44,6)	233	27,7 (16,3 - 48,6)	1143	28,1 (16,0 - 52,1)	154	28,3 (16,5 - 50,3)
30 - 40 ans	14	32,1 (25,4 - 53,2)	212	28,0 (14,9 - 49,0)	1055	27,8 (16,0 - 49,5)	177	27,5 (15,8 - 56,0)
40 - 50 ans	25	28,6 (20,5 - 51,9)	117	27,3 (16,5 - 56,4)	1010	28,3 (16,2 - 51,7)	171	29,0 (19,9 - 59,7)
50 - 60 ans	25	33,3 (23,1 - 61,9)	81	30,9 (17,6 - 57,5)	566	31,8 (18,1 - 58,3)	111	32,8 (19,7 - 63,8)
60 - 70 ans	21	36,6 (21,3 - 57,4)	33	32,3 (20,9 - 45,9)	273	32,7 (20,2 - 58,2)	73	33,5 (19,6 - 69,9)
70 - 99 ans	4	35,0 (30,3 - 49,8)	5	28,8 (20,7 - 44,4)	56	33,3 (22,0 - 61,3)	19	33,2 (17,4 - 62,7)

9.2.2.10. Influence de l'environnement

Selon une étude récente dans une usine, les agressions sonores et les vibrations entraînent chez les ouvriers des valeurs enzymatiques plasmatiques supérieures à la normale pendant la période de repos (87). A la fin du travail, par contre, le niveau de la GOT est plus faible par rapport aux valeurs à l'arrivée.

Les variations de la GOT en fonction de l'altitude sont différentes de celles de la glycémie. HIGHMAN (205) constate une hyperglycémie et une activité plus élevée de la S GOT, chez des chiens placés dans des conditions de simulation de haute altitude. Seules l'hypoxie et la baisse de la pression dans la chambre d'expérimentation sont en cause. La température reste fixe pendant toute la durée de l'expérience.

La phase hyperglycémique apparaît quatre heures après le début des essais. Elle est suivie, deux heures après, par une augmentation de la GOT. L'apparition de la GOT dans le plasma serait due à une libération de catécholamines qui augmentent la perméabilité de la membrane cellulaire.

Ces perturbations sont transitoires.

La glycémie revient à des valeurs normales après 24 heures. Par contre, l'activité de la GOT ne s'abaisse qu'après trois à quatre jours. Il est probable que ce décalage soit dû à une accumulation des métabolites pendant la phase d'adaptation à la haute altitude. Ceux-ci inhiberaient partiellement l'activité de l'enzyme.

Ayant défini les valeurs de référence de la GOT plasmatique selon l'âge, le sexe, l'état nutritionnel et l'activité professionnelle, nous les avons comparées avec celles d'une population de diabétiques ou prédiabétiques.

9.3. VALEURS OBTENUES CHEZ DES SUJETS DIABETIQUES

Nous avons dosé la GOT plasmatique chez 37 sujets diabétiques ou prédiabétiques.

Les prélèvements ont été effectués dans les conditions habituelles au laboratoire, chez les sujets à jeûn, 1 heure après injection d'insuline, et entre 1 h et 3 h après la prise d'un comprimé du médicament hypoglycémiant utilisé habituellement.

Nous avons utilisé la méthode cinétique à 37°C sur Automate 5010 Eppendorf pour éviter les interférences des corps cétoniques dans le dosage colorimétrique de la GOT selon la méthode de MORGENSTERN (327) observées par CHEN (235) et SAX et MOORE (325, 401).

Nous n'avons pas observé de différences avec une population normale de même sexe, de même âge et à jeûn.

La multiplicité des facteurs techniques, physiologiques et d'environnement faisant varier le niveau de la GOT, implique une standardisation très poussée des conditions expérimentales. Cette remarque est plus particulièrement justifiée lorsque la concentration enzymatique du tissu analysé est élevée. C'est le cas du foie que nous avons utilisé pour l'étude du mode d'action des biguanides hypoglycémiantes chez l'animal, que nous présentons à la suite, dans la troisième partie de notre travail.

Ces méthodes d'extraction, d'ultracentrifugation, de chromatographie et d'électrophorèse nous ont permis d'aborder l'étude de l'action des biguanides

IN VIVO

- . sur les isoenzymes de la GOT
en séparant par électrophorèse les isoenzymes des extraits tissulaires d'animaux traités

IN VITRO

- . sur les isoenzymes isolées et purifiées par chromatographie sur colonne de cellulose DE 52
- . sur les mitochondries entières séparées par ultracentrifugation

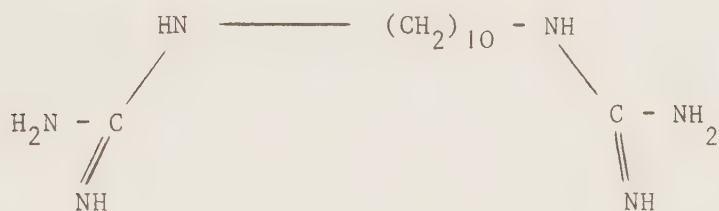
T R O I S I E M E P A R T I E

APPLICATION AU MECANISME D'ACTION DES BIGUANIDES HYPOGLYCEMIANTS

CHAPITRE X

UTILISATION THERAPEUTIQUE DES BIGUANIDES. HYPOTHESES SUR LES MECANISMES D'ACTION

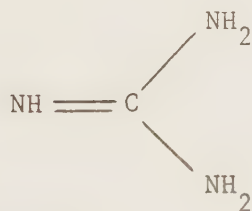
Les biguanides sont des dérivés de la guanidine.
Dès 1927, une diguanidine, la Synthaline, avait été utilisée dans le traitement oral du diabète.



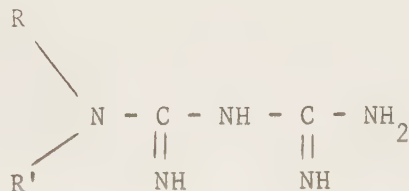
Synthaline

Mais les guanidines avaient provoqué des effets toxiques.
C'est pourquoi elles ont été remplacées, depuis 1957, par les biguanides de toxicité inférieure, mais aussi d'activité pharmacologique plus faible.

Les biguanides résultent de la condensation de deux molécules de guanidines :



Guanidine



Biguanide

Le N-Phényléthylbiguanide (DBI-Phenformin-Insoral-W32) et le NN' Diméthylbiguanide (DMB-Glucophage-Metformin LA 6023) sont couramment utilisés en France.

Le N-butylbiguanide ou Buformin ou W 37 ou Silubin est le troisième biguanide utilisé en thérapeutique journalière.

Nous nous sommes limités à l'étude du mode d'action de deux d'entre eux : le Diméthylbiguanide (DMB) et le Phényléthylbiguanide (DBI).

10.1. METABOLISME DES BIGUANIDES

Les deux biguanides ne sont pas métabolisés de façon identique.

Après injection de DMB marqué sur deux atomes de carbone à des souris, COHEN et COSTEROUSSÉ (81, 82) constatent une localisation préférentielle dans les anses intestinales et dans les glandes salivaires des souris. Aucune fixation n'est observée dans le foie, ni dans le rein. L'urine devient radioactive peu après l'administration. L'élimination totale du produit intact se fait en 6 à 8 heures. Une faible proportion est éliminée dans les selles. Le DMB ne s'accumule pas dans le sang. Après des prises répétées, le produit est stocké dans l'organisme et la quantité éliminée dans l'urine peut être supérieure à celle administrée la veille. L'effet antidiabétique est lié à la concentration du biguanide dans le sang.

Le métabolisme du DBI est exploré par WICK (493) par marquage du groupement phénolique au C^{14} . Chez le rat, le produit s'accumule de façon préférentielle dans le suc gastrique et le foie, mais aussi dans le tissu adipeux, le muscle, l'intestin grêle, le cœur et les reins. Chez les animaux peu sensibles au DBI comme le rat, la rétention du produit par le foie et le rein est faible alors qu'elle est très nette chez les animaux sensibles comme le cobaye. L'accumulation du produit dans le sang est particulière au cobaye après une injection en sous-cutanée alors que chez le rat et le porc, elle a lieu préférentiellement dans l'intestin grêle. Environ 80 % de la dose administrée sont éliminés dans l'urine après 24 heures sauf chez le rat, chez lequel on ne retrouve que 25 %.

Le DBI est complètement métabolisé dans l'organisme, contrairement au DMB (498). Plusieurs métabolites ont été isolés dans l'urine : l'un est une monoguanidine avec un noyau aromatique parahydroxylé, l'autre étant le dérivé glucuroconjugué de celui-ci (332). Dans le foie de rat, le DBI est hydroxylé à une vitesse beaucoup plus grande que dans le foie de cobaye (213).

Le DMB et le DBI ont donc deux métabolismes différents dans l'organisme. Le premier s'accumule sélectivement dans l'intestin et les glandes salivaires et n'est pas métabolisé, l'autre est capté par de nombreux organes, subit une transformation dans le foie avant d'être éliminé. La sensibilité varie selon l'espèce animale et une susceptibilité individuelle rend plus difficile encore l'exploitation des résultats. Ces observations laissent présager un mode d'action complexe et particulier à chacun.

10.2. PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES

Une bibliographie très vaste et souvent contradictoire témoigne de l'action des biguanides dans des domaines apparemment divers : activité hypoglycémiant au cours du diabète pancréatique, altération du métabolisme des lipides, influence sur le poids...

10.2.1. Effet hypoglycémiant

Le DMB et le DBI sont employés en thérapeutique pour leur action hypoglycémiant au cours d'un diabète. Cette action est précédée d'une phase hyperglycémique brève mais constante qui peut masquer la phase hypoglycémique chez les animaux peu sensibles aux biguanides. A une élévation de la glycémie correspond une glycogénolyse hépatique ainsi qu'une décharge d'adrénaline (118, 452).

L'effet hypoglycémiant varie en fonction du biguanide utilisé. La dose efficace est différente selon l'espèce animale, l'état nutritionnel et la susceptibilité individuelle. L'hypoglycémie ne peut être inversée que partiellement par injections répétées de glucose en raison de l'effet retard des biguanides. On peut constater que les biguanides n'ont pas d'effet hypoglycémiant chez les animaux sains et chez l'homme, aux doses thérapeutiques habituelles. Par contre, on peut mettre en évidence un aplatissement de la courbe d'hyperglycémie provoquée après absorption de biguanides, chez l'homme non diabétique (31).

Le mode d'action est donc fonction de l'état diabétique et la dose "antidiabétique" peut être distinguée de la dose "hypoglycémiant".

Les doses généralement admises chez l'homme sont de 3 à $18 \times 10^{-3} \text{M}$ par jour pour le DMB et de 5×10^{-5} à $30 \times 10^{-5} \text{M}$ par jour pour le DBI. Ces doses sont réduites au cours d'un traitement associé à de l'insuline ou des sulfamides. La forme retard des deux biguanides abaisse encore la prise quotidienne tout en prolongeant les effets.

A des doses thérapeutiques, la concentration en biguanides dans le plasma est de 5×10^{-5} M/l dans le cas du DMB et $0,2 \times 10^{-5}$ M/l dans le cas du DBI. Chez l'animal, la concentration plasmatique des biguanides est 10 fois plus faible que dans le foie et 30 à 100 fois plus faible que dans la paroi intestinale (31).

L'effet hypoglycémiant est obtenu 8 jours environ après le début du traitement (139). La baisse de la glycémie est progressive pour atteindre une valeur minimum, six heures après la prise du biguanide. Celui-ci est efficace pendant 12 à 14 heures, après quoi la glycémie augmente brutalement.

10.2.2. Toxicité

Nous ne nous attarderons par sur la toxicité chronique et les effets secondaires qui n'apportent rien à la compréhension du mécanisme d'action. Par contre avec le DMB par voie sous-cutanée, et à des doses léthales uniquement, il est observé un désordre électrolytique sanguin prononcé au moment de la mort de l'animal dans un état d'hypothermie et de convulsions irréversibles. Toutefois avant le stade des convulsions, les concentrations du potassium sanguin augmentent considérablement quelles que soient la durée du jeûne et la dose. L'élévation du calcium et du phosphore est fonction de l'espèce animale. Par contre la natrémie et la chlorémie ne varient pas. Le rein n'intervient donc pas dans les phénomènes précédents (117, 118, 452).

10.2.3. Effet sur les diabètes expérimentaux

Les essais des médicaments hypoglycémians sont effectués en général, sur des animaux rendus diabétiques. Le manque de sensibilité pour apprécier l'effet hypoglycémiant est dû à la mauvaise reproductibilité des méthodes d'obtention d'un diabète expérimental. De plus, l'importance des lésions provoquées, ne peut être évaluée de façon rigoureuse.

10.2.3.1. Action du Diméthylbiguanide seul

Chez le cobaye atteint d'un diabète alloxanique de sévérité moyenne, le DMB a un effet hypoglycémiant dans 50 % des cas. Dans 25 % des cas, le résultat est faible avec une glucosurie persistante et aucun gain de poids. 25 % sont insensibles.

Une dose massive de 700 mg/kg de DMB, administrée à des rats par voie orale 4 jours après injection d'alloxane, est efficace pendant 24 heures chez tous les animaux. Les résultats sont indépendants de la sévérité du diabète (118).

Le DMB n'a aucun effet hypoglycémiant sur le chien ayant subi une pancréatectomie totale. Il permet par contre d'abaisser les besoins en insuline de moitié (118).

Le DMB n'a pas d'effet hypoglycémiant dans les cas de diabète provoqué par la phloridzine car les fonctions rénales sont altérées (452).

10.2.3.2. Action du Phényléthylbiguanide

Les résultats sont parfois contradictoires, dûs probablement aux conditions expérimentales différentes (452).

- Diabète de type alloxane

Une dose de 50 mg/kg administrée pendant trois jours par voie orale, ramène la glycémie dans les limites normales chez le rat, le lapin et le singe.

- Diabète après pancréatectomie

Le DBI est inactif chez le chien totalement pancréatectomisé.

Il paraît donc indispensable de conserver intact un nombre minimum de cellules pancréatiques pour que l'action hypoglycémiante des deux biguanides continue à se manifester.

10.2.4. Utilisation thérapeutique chez les diabétiques

Les biguanides sont considérés comme les médicaments de choix dans le traitement du diabète stable de l'adulte, insulino-indépendant, sans acidocétose, "florissant", insensible aux diètes prescrites. Ils contrôlent le niveau de la glycémie et de la glucosurie, tout en réduisant progressivement le poids du sujet et le taux de cholestérol sanguin.

Une étude statistique montre que le nombre de succès atteint 61,5 % parmi 26 sujets obèses traités. Il est de 30,8 % dans une série de sujets ayant un poids normal et de 7 % seulement lorsque les sujets sont maigres (309).

Par contre, les biguanides sont inefficaces pour enrayer la cétogénèse provoquée par la mobilisation permanente des acides gras en l'absence de traces d'insuline exogène. Ils ne peuvent donc être administrés seuls, à des diabétiques totalement insulino-dépendants et donc, sujets à la cétose. Dans ce cas, une association insuline-biguanide est souhaitable puisqu'elle permet d'abaisser les besoins en insuline (309, 452).

Outre leur effet curatif, les biguanides ont également un effet préventif dans les états prédiabétiques (452). Des doses régulières de 50 mg par jour de DBI-retard, administrées pendant six semaines, diminuent le nombre de diabètes déclarés au cours des trois années suivantes.

Le test de surcharge au glucose associé à la cortisone redevient normal dans plus de 50 % des cas. Ce test permet également d'étudier l'action des biguanides sur la libération de l'insuline exogène. Administré sept jours avant le test de surcharge, le DBI-retard diminue la réponse de l'insuline à la surcharge glucosée (309) et s'oppose à l'action de la cortisone sur le pancréas. Le DBI peut être employé d'autre part pour dépister plus précocement des diabètes latents, en particulier chez les patients obèses (452).

Mais les réponses souvent peu significatives sont à l'origine de son abandon dans cette voie d'exploration fonctionnelle.

10.3. MECANISMES D'ACTION

Le diabète est caractérisé essentiellement par une hyperglycémie et les biguanides par un effet hypoglycémiant dans ce syndrome. Le niveau glycémique traduit l'équilibre dynamique existant entre le glucose déversé dans la circulation et le glucose consommé par l'organisme. La régulation de la glycémie est liée à celle de l'apport énergétique total, non seulement en glucides, mais également en protides et lipides. Il existe en effet d'importantes corrélations entre les trois métabolismes par l'intermédiaire en particulier, des acides gras libres, des acides aminés et des corps cétoniques pour assurer l'adaptation de la distribution des substrats énergétiques à l'organisme.

La stabilité remarquable de la glycémie est due à des mécanismes régulateurs d'origine hormonale ou métabolique qui interviennent soit - pour emmagasiner (ou éliminer) le glucose apporté en excès, soit - pour libérer du glucose à partir de ses formes de réserve ou le resynthétiser par la voie de la gluconéogénèse dans les cas de carence en glucose.

La normalisation de la glycémie chez le diabétique traité par les biguanides laisse supposer un mécanisme d'action possible sur l'un de ces mécanismes régulateurs.

La synthèse des travaux réalisés dans ce domaine, est rendu difficile à cause des conditions expérimentales très variables utilisées

- animaux différents : rat, cobaye, singe, porc, normaux ou rendus diabétiques
- organes différents : tissu adipeux, foie, rein, diaphragme, muscle squelettique...

De plus, les quantités de biguanides administrées, sont souvent voisines des doses toxiques.

Nous avons tenté de faire le relevé des mécanismes d'action proposés jusqu'à présent pour les biguanides.

10.3.1. Effet sur l'insuline

L'activité hypoglycémiante des biguanides semble liée à celle de l'insuline.

- . En effet, l'action des biguanides ne se manifeste qu'en présence d'un nombre minimum de cellules pancréatiques intactes.
- . D'autre part, le traitement n'est efficace que chez les diabétiques partiellement insulino-dépendants (diabète stable de l'adulte, diabète de l'obésité), chez lesquels la concentration en insuline endogène est élevée (309).
- . Enfin, ces médicaments réduisent la libération massive de l'insuline post-prandiale (31, 182, 477), ou après une surcharge glucosée, chez les sujets obèses, diabétiques et prédiabétiques (139, 178, 194, 281, 378, 452, 492).

Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer l'activité de l'insuline par les biguanides hypoglycémiantes.

10.3.1.1. Action sur la sécrétion d'insuline

Contrairement aux sulfamides, les biguanides n'excitent pas la sécrétion d'insuline (182, 452).

L'absence d'effet hypoglycémiant chez les sujets normaux est donc compatible avec cette hypothèse.

L'aspect histologique des cellules du pancréas ne subit aucun changement, même après traitement prolongé (452).

L'activité de l'insuline plasmatique ne varie pas (452, 458) ce qui indique que les biguanides n'ont pas d'action sur l'activité de l'insuline elle-même et ne prolongent pas sa durée de vie (452).

Ces résultats ont été repris récemment par STERNE (453) qui a montré au contraire, une prolongation de l'action de l'insuline après traitement par le DBI. Cependant STERNE ne dose pas l'activité de l'insuline elle-même, mais le niveau de la glycémie.

10.3.1.2. Action sur la libération de l'insuline à partir de son complexe protéique

Chez les diabétiques, la majeure partie de l'insuline circulante se trouve, sous forme liée, donc inactive. Selon BUTTERFIELD (64) et WHICHELOW (492) les biguanides hypoglycémiantes libèrent l'insuline à partir de son complexe protéique. Ils améliorent ainsi la clearance de l'insuline périphérique et la captation cellulaire du glucose.

Cette hypothèse n'est pas admise par STERNE (452) et HOLLOBAUGH (213). En effet, elle n'a pas été vérifiée jusqu'à présent de façon expérimentale. D'autre part, le taux d'insuline libre n'est pas augmenté après un traitement par les biguanides.

10.3.1.3. Neutralisation des anticorps anti-insuliniques

Cette hypothèse séduisante ne peut couvrir l'ensemble des mécanismes d'action des biguanides, même s'ils ont un effet dans les cas d'insulino-résistance (452).

10.3.1.4. Action sur la sensibilisation de l'organisme à l'insuline

Les avis sont partagés : Des arguments en faveur de cette hypothèse peuvent être avancés :

- . Sous l'influence des biguanides, les besoins en insuline sont abaissés chez les diabétiques insulino-sensibles.
- . Les chiens pancréatectomisés sont maintenus en vie en présence d'une faible quantité d'insuline et de DMB (452).
- . L'insuline seule ou un biguanide seul n'a pas d'effet hypoglycémiant chez les animaux totalement éviscérés et néphrectomisés alors que leur association est active (452).

Si le DBI est administré régulièrement pendant dix jours avant une perfusion d'insuline intra-artérielle, l'action de celle-ci est potentialisée (452). Il en est de même en administrant du DMB par voie orale à un lapin deux heures avant une injection intra-veineuse d'insuline (453). La captation cellulaire du glucose est améliorée alors que la glycémie décroît fortement. Cette observation est en faveur d'une action indirecte des biguanides sur les effets de l'insuline.

10.3.1.5. Action sur la membrane cellulaire

L'amélioration de la perméabilité des membranes sous l'action de l'insuline est un fait acquis. Il est possible que les biguanides aient une action similaire ou complémentaire de celle de l'insuline (309, 452). D'après les travaux de MEYER (312), le pourcentage d'inhibition in vitro de l'oxydation du succinate est plus élevée sur un homogénat de foie que sur des mitochondries traitées par la digitonine (452). Cette inhibition est plus marquée avec le DBI qu'avec le DMB.

10.3.1.6. Augmentation de l'oxydation périphérique du glucose

Les biguanides modifient le contrôle de la glycémie par une augmentation de la consommation périphérique du glucose, liée à la potentialisation de l'effet insulinique (492). Ce contrôle est différent chez le diabétique et l'homme sain. La consommation du glucose est supérieure dans le premier cas et engendre une baisse de la glycémie. Sa production est prédominante dans le second cas pour éviter une hypoglycémie (252, 253, 281, 429).

Pour expliquer l'absence d'une chute de la glycémie chez le sujet non diabétique, SEARLE (253) suppose que l'effet hypoglycémiant des biguanides est compensé par une élévation de la gluconéogénèse hépatique. D'autre part, MARGOLIS (290), MIROUZE (320) et BOUAZIZ (50) observent chez des sujets diabétiques des modifications du débit hépatique correspondant à une augmentation de la consommation cellulaire du glucose. Ce débit est accéléré avec les deux biguanides mais seul un traitement par le DMB entraîne une augmentation du coefficient d'assimilation glucidique. Les résultats obtenus chez les sujets obèses non diabétiques sont inconstants (407).

La théorie d'une action périphérique accrue n'est pas admise par STERNE (452) car elle n'englobe pas l'ensemble des effets des biguanides, en particulier leur action sur la sécrétion insulinique au cours d'un test d'hyperglycémie provoquée.

10.3.2. Action sur les réserves en glycogène

10.3.2.1. Foie

L'action est différente si l'expérimentation est faite sur un animal sain ou diabétique.

Les réserves en glycogène hépatique de l'animal sain ne sont utilisées qu'à des doses élevées et en particulier, après une période de jeûne. Le glycogène disparaît complètement après injection de 800 mg/kg de DMB en sous-cutanée, à des rats non à jeûn. Curieusement, les variations du glycogène hépatique ne sont pas parallèles aux valeurs de la glycémie. La déplétion glycogénique précède l'hypoglycémie, qui n'apparaît pas dans certains cas. En fait, cette mobilisation correspondrait à une lutte contre l'hypoglycémie (118, 452).

La réaction est différente chez l'homme et les animaux diabétiques. La réserve de glycogène hépatique est plus élevée après traitement par les biguanides (452). Une déplétion apparaît deux heures après l'injection et une accumulation après quatre heures (470). Le dépôt de glycogène est plus important après une surcharge lipidique (2, 295). Ces observations sont confirmées en mesurant directement la glycémie dans les veines hépatiques. Elle est plus basse dans la veine cave inférieure que dans la veine hépatique supérieure.

10.3.2.2. Muscle

Les variations du glycogène musculaire par contre, suivent celles de la glycémie.

UNGAR (470) observe peu de changements du glycogène musculaire après administration de 20 mg/kg de DBI à des cobayes ou de 500 mg/kg à des rats traités par l'alloxane. Utilisant du DMB, DUVAL (118) met en évidence une glycogénolyse musculaire partielle chez des rats non à jeûn après administration de 200 à 350 mg/kg par voie sous-cutanée ou 350 mg/kg par voie orale. Elle est plus prononcée dans le diaphragme que dans le quadriceps, mais elle reste inférieure à celle observée dans le foie. Elle est lente. Elle ne correspond pas à la diminution du glycogène hépatique mais varie parallèlement à la glycémie.

Contrairement aux observations faites sur le glycogène hépatique, le muscle libère ses réserves en glycogène après un traitement par les biguanides.

10.3.3. Effets métaboliques

10.3.3.1. Action sur les lipides

10.3.3.1.1. Propriétés anorexigènes (139, 237, 458)

Le traitement par les biguanides provoque un amaigrissement faible mais continu chez les obèses traités.

Cet amaigrissement s'observe surtout dans les cas de diabète instable avec surcharge pondérale, dans les cas de prédiabète mais aussi, d'artériosclérose sans diabète (16, 30, 79, 99, 115, 139, 236, 237, 253, 281, 309, 320, 359, 378, 379, 380, 425, 452, 458, 488).

La perte de poids est parallèle à une amélioration du coefficient d'assimilation glucidique, abaissé chez les obèses diabétiques non traités (320). Les biguanides sont parfois utilisés pour le dépistage des diabètes latents chez les sujets obèses (178, 309, 320, 380, 492).

Une action de ces médicaments sur le métabolisme des lipides semblait logique. En effet, les valeurs élevées des lipides sanguins totaux, du cholestérol et des acides gras estérifiés, sont ramenées à des valeurs plus basses (30, 139, 236, 237, 252, 309, 425, 452, 488).

Les résultats obtenus avec les triglycérides et les β lipoprotéines sont inconstants (99, 425, 452).

10.3.3.1.2. Malabsorption des lipides (30, 458)

Ce mécanisme d'action pourrait expliquer les résultats obtenus par MARQUIE et AGID (295). Ces auteurs n'observent la chute de la lipémie chez le lapin qu'après surcharge orale de DMB et de cholestérol.

FORSTER (145) observe au contraire, une augmentation des lipides du sérum et une réduction de l'absorption des lipides, plus marquées au cours du diabète.

Ces observations sont effectuées sur le rat avec le butylbiguanide. Il est donc possible que les mécanismes d'action du DMB et du butylbiguanide soient différents.

10.3.3.1.3. Inhibition de la lipogénèse

Les études menées dans ce domaine montrent un ralentissement de la lipogénèse en présence ou non d'insuline (96, 309, 452).

10.3.3.1.4. Accélération de la lipolyse

Les biguanides ralentissent les infiltrations lipidiques dans le foie et les artères (1, 2, 295, 296, 452). Le DMB est dans ce cas plus efficace que le DBI. Le glycérol libéré à partir des triglycérides pourrait donc être transformé en glycogène par la voie de la gluconéogenèse (2). Après un traitement prolongé, le taux des acides gras libres plasmatiques est inférieur au taux initial (309, 331, 378, 452). Mais ces résultats sont inconstants. Chez le lapin à des doses de 150 mg/kg/j, le DMB provoque une augmentation de la concentration des acides gras libres qui pourrait correspondre à un ralentissement transitoire de leur oxydation.

De plus, les biguanides abaissent l'activité antilipolytique de l'insuline (99, 309).

L'effet hypoglycémiant des biguanides semble donc lié à l'effet hypolipémiant. Il serait secondaire à ce dernier.

10.3.3.1.5. Correction de la cétogénèse

Une tendance à la cétonurie est signalée uniquement au cours des traitements par le DBI (452). La clé du contrôle de l'acido-cétose est un ralentissement de la lipolyse et une accélération de la lipogénèse. C'est d'ailleurs le rôle de l'insuline. Le DBI, en revanche, ne répond pas à ces deux impératifs.

L'action cétogène du DBI est indirecte car ce composé réduit la sécrétion de l'insuline post-prandiale.

10.3.3.1.6. Action sur le tissu adipeux

L'exploration du métabolisme du tissu adipeux a fait l'objet de plusieurs travaux, mais les essais *in vitro* ont abouti à des résultats difficiles à rassembler du fait des doses variables.

. Les biguanides bloquent le shunt des pentoses avec une accumulation parallèle d'acide lactique :

- en inhibant la décarboxylation du pyruvate et par conséquent de l'acétate (362)
- en ralentissant la production de NADPH (6, 309).

. L'inhibition de la phosphorylation oxydative entraînerait une chute de la concentration en ATP nécessaire à la synthèse des triglycérides (178, 397)

. La pénétration du glucose dans les adipocytes est bloquée (309, 452).

Il semble cependant improbable que les biguanides exercent leur effet thérapeutique en agissant directement sur le tissu adipeux (443, 452).

10.3.3.2. Ralentissement de l'absorption intestinale du glucose

Au cours des épreuves d'hyperglycémie provoquée, CZYCZYK et coll. (95) observent un abaissement de la flèche hyperglycémique lorsque l'épreuve de surcharge en glucose est faite par voie orale et en présence de biguanides. Elle n'est pas modifiée au cours d'une épreuve par voie intra-veineuse.

Les travaux de CZYCZYK ont été confirmés par ceux de HOLLOBAUGH et coll. (213) et ceux de BERGER (31).

BERCHTOLD (30) et STOWERS (458) observent parallèlement une absorption plus faible de la vitamine B₁₂ et du D-xylose.

Les biguanides, en s'accumulant dans la cellule intestinale, bloqueraient la synthèse d'ATP nécessaire au transport actif du glucose.

Cette hypothèse est confirmée par les travaux de KRUGER (256) et CASPARY (69) sur des anses isolées d'intestin de rats. Une réserve doit être faite car les doses utilisées sont proches des doses toxiques. Soulignons encore que des dosages de glucose fécal n'apportent pas la preuve de ce mode d'action possible.

Le ralentissement de l'absorption intestinale des glucides ne suffit pas à expliquer l'action hypoglycémiante des biguanides ni leur inefficacité chez le sujet sain.

10.3.3.3. Action sur les acides aminés

Chez les sujets diabétiques et obèses, la concentration en amino-acides plasmatiques et urinaires est élevée. Elle augmente encore au cours du traitement par les biguanides hypoglycémiantes (218, 452).

Au cours d'essais effectués in vitro, SÖLING (442) observe un ralentissement de l'élimination des acides aminés et de l'urée dans le liquide de perfusion du foie en présence de butylbiguanide.

Ces observations sont liées étroitement à l'effet des biguanides sur la gluconéogenèse.

10.3.3.4. Action sur la gluconéogénèse

Deux hypothèses s'affrontent pour expliquer le mécanisme d'action des biguanides hypoglycémisants :

- l'une est en faveur d'une modification de l'équilibre de la glycolyse et de la gluconéogénèse
- l'autre, au contraire, tend à prouver une inhibition de la gluconéogénèse.

10.3.3.4.1. Modification de l'équilibre de la glycolyse et de la gluconéogénèse

KREISBERG (252, 253) et SEARLE (428, 429) observent une accélération du turn-over et du recyclage du glucose en présence de DBI, probablement par une stimulation de la gluconéogénèse. Cette stimulation de la gluconéogénèse pourrait expliquer l'accumulation de glycogène hépatique au cours des traitements par les biguanides (2).

10.3.3.4.2. Inhibition de la gluconéogénèse

LYNGSOE (282) constate une diminution statistiquement significative de l'azote total urinaire chez des sujets à jeûn, soumis à un traitement par le DBI.

L'inhibition de la gluconéogénèse hépatique et rénale est également évoquée par d'autres auteurs (5, 309, 452, 483). Elle serait consécutive :

- . soit à une inhibition des enzymes de la gluconéogénèse
- . soit à une interaction avec les coenzymes métalliques des enzymes de la gluconéogénèse (269)
- . soit à une modification de la perméabilité de la membrane mitochondriale (218)
- . soit à une inhibition de la respiration mitochondriale

Ces quatre hypothèses seront développées dans les chapîtres qui suivent.

En conclusion, les mécanismes d'action des biguanides, proposés dans la littérature, sont nombreux et parfois contradictoires.

Ces médicaments semblent intervenir dans le métabolisme des glucides, lipides et protéides. Parmi les hypothèses avancées, celle d'une inhibition de la gluconéogénèse qui a fait l'objet de plusieurs travaux récents, nous a sembler intéressante. Mais il est vraisemblable de penser que les biguanides agissent simultanément sur plusieurs fonctions.

Pour tenter d'apporter notre contribution au mécanisme d'action des biguanides hypoglycémiantes, nous avons étudié successivement leurs effets :

- In vitro

- . sur les enzymes et les isoenzymes, plus particulièrement, celles de la GOT
- . sur les mitochondries isolées et purifiées

- In vivo

- . chez l'homme et chez le rat.

Nous commencerons par ce dernier aspect, limité à une comparaison des patients diabétiques et de sujets sains.

CHAPITRE XI

ETUDE DE L'EFFET DES BIGUANIDES CHEZ L'HOMME

Tout au début de notre travail, nous avons pensé que la séparation et le dosage des 2 oxo-acides par chromatographie, pouvaient nous donner des résultats intéressants. Puis, beaucoup plus récemment, nous avons pensé, comme pour d'autres molécules, (antiépileptiques, anticonceptionnels), vérifier leur influence sur les paramètres biologiques.

11.1. 2.OXO-ACIDES URINAIRES

Les hydrazones extraites des urines de sujets diabétiques, traités soit par l'insuline, soit par des biguanides, ont été soumises à la chromatographie en couche mince selon la technique précédemment décrite.

Nous n'avons pas obtenu de résultats interprétables par élution des spots d'hydrazones à cause :

- du manque de sensibilité de la réaction colorée
- de la concentration minime des 2 oxo-acides dans les liquides biologiques
- de la présence d'isomères
- de la longueur des manipulations
- des pertes importantes au cours de la récupération des spots

Cependant, il ne semble pas qu'il y ait de différence importante. Il serait intéressant de reprendre les dosages avec des techniques enzymatiques.

11.2. PARAMETRES CHIMIQUES - ACTIVITES ENZYMATIQUES PLASMATIQUES

Des échantillons de plasma de sujets diabétiques nous ont été transmis par des laboratoires privés ainsi que par le service de Diabétologie (Prof.DEBRY). Notre étude se limite à 37 cas parmi lesquels 27 sont traités par les biguanides hypoglycémiantes seuls, ou associés à l'insuline ou aux sulfamides hypoglycémiantes.

Le prélèvement est effectué le matin vers 10 heures chez des sujets à jeûn, ayant absorbé un comprimé de biguanide à 7 heures.

Généralement, les malades sont âgés de plus de 40 ans. Le diabète est souvent associé à un autre état pathologique : hypertension, cardio angiopathie, cirrhose, hépatite, anémie, hyperplaquettose soigné par une médication associée à celle des hypoglycémiantes.

Le traitement par le Glucophage-retard seul ou associé à des sulfamides hypoglycémiantes est prescrit généralement à des sujets âgés obèses.

La non homogénéité de ce groupe nous incite à être très prudents sur l'interprétation de nos résultats, en fonction du traitement par les biguanides hypoglycémiantes.

Nous avons dosé dans le plasma : le calcium, le phosphore, le glucose, l'urée, l'acide urique, le cholestérol, les protéines, l'albumine, la bilirubine, la créatinine, le magnésium, le sodium, et le potassium. Nous avons également mesuré les activités enzymatiques de la GOT, la MDH, la GPT et les phosphatases alcalines.

Les valeurs biologiques sont voisines de celles établies sur une population saine, du même sexe et du même âge. Les valeurs de la glycémie sont comprises dans les fourchettes des valeurs établies pour une population saine, du même sexe et du même âge.

L'activité de la GOT dans le plasma n'est pas modifiée. Elle est légèrement abaissée cependant dans un cas de pancréatite chronique insulino-dépendante et dans un second cas d'obésité non diabétique, traitée par le Glucophage-retard. Les concentrations plus faibles du sodium et de la créatinine, de l'urée, de l'albumine et de la bilirubine, sont dues à des régimes hypocaloriques. Les variations des autres paramètres chimiques selon les sujets (augmentation du potassium, de la LDH, de la GPT, diminution du calcium et du cholestérol) peuvent être attribuées aussi bien à l'effet des biguanides qu'à l'état pathologique associé au diabète et son traitement. Les mêmes réserves peuvent être formulées pour les variations observées au cours des traitements par l'insuline ou par les sulfamides hypoglycémiantes. Dans un cas, nous avons reçu deux prélèvements effectués à des périodes différentes, avant et après absorption d'un comprimé de DMB. Les valeurs des paramètres biologiques ne sont pas modifiées.

Ces résultats quoique critiquables, nous montrent que les variations des paramètres biologiques dans le plasma, après un traitement par les biguanides hypoglycémiants, sont minimales.

Nous avons alors orienté notre travail vers l'étude de l'effet des biguanides sur les tissus. Celle-ci n'a pu être effectuée que sur l'animal.

CHAPITRE XII

JEÛNE ET GLUCONEOGENESE

La gluconéogénèse conduit à la biosynthèse du glucose et éventuellement du glycogène à partir de substrats non glucidiques.

- . acides aminés : alanine, acide glutamique, arginine, acide aspartique, cystéine, glyco-colle, histidine, hydroxyproline, proline, sérine, thréonine
- . pyruvate
- . lactate

Parmi d'autres hypothèses, l'inhibition de cette voie par les biguanides hypoglycémiantes a plus particulièrement retenu notre attention.

Avant d'aborder notre travail expérimental, il nous a semblé utile de faire un bref rappel des connaissances actuelles sur la gluconéogénèse chez l'homme et l'animal.

12.1. CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LA GLUCONEOGENESE

La gluconéogénèse est augmentée au cours du jeûne, du diabète et après injection de corticoïdes.

Au cours du jeûne, l'homme, à la différence des rongeurs, préserve partiellement son stock de glycogène. Il cherche d'autre part, à épargner ses réserves protéiques. Dans des études portant sur des adultes soumis à un jeûne de 8 jours, CAHILL (66) a montré que l'azoturie s'élève du 2^e au 3^e jour, atteint un maximum au 4^e jour, puis décline. Si le jeûne se prolonge, l'azoturie s'abaisse encore car la gluconéogénèse à partir des acides aminés diminue. Cette épargne azotée permet ainsi une survie prolongée.

Lorsque le jeûne dure 5 jours, la concentration plasmatique de valine, leucine, isoleucine, méthionine, cystine, aminobutyrate augmente. Cette élévation est très marquée dans le cas des acides aminés ramifiés. Après 5 jours, le niveau de ces acides aminés décroît et atteint après 40 jours de jeûne des valeurs inférieures aux valeurs de base (temps 0).

Par contre, la glycine, la thréonine, la sérine diminuent progressivement pendant un jeûne de 3 jours puis augmentent lorsque le jeûne se prolonge. Enfin, l'alanine décroît brutalement durant les dix premiers jours du jeûne puis s'abaisse progressivement jusqu'à 40 jours (137, 138).

L'adaptation est donc différente selon qu'il s'agisse d'un jeûne de courte durée ou d'un jeûne de longue durée (66, 138).

12.1.1. Jeûne de courte durée

Au cours d'un jeûne de courte durée, l'oxydation complète du glucose en gaz carbonique par le système nerveux est limitée.

Les autres tissus (cardiaques, rénaux et musculaires) peuvent utiliser les acides gras plasmatiques ou bien les corps cétoniques (acéto acétate et β hydroxybutyrate) produits au niveau du foie. Ces tissus ne métabolisent donc pas de grandes quantités de glucose, ce qui retarde la nécessité de la gluconéogénèse et préserve les stocks de protéines. Le foie est au centre de ces mécanismes d'adaptation. En effet, lui seul peut convertir le glycérol, le lactate, le pyruvate et les acides aminés glucogéniques en glucose.

L'apport d'énergie est fourni par l'oxydation partielle des acides gras en acétyl CoA et par la combustion finale de l'acétyl CoA dans le cycle tricarboxylique (353). Au cours de la cétose, cette première étape procure aussi la plus grande partie de l'énergie hépatique car la fonction du cycle tricarboxylique est diminuée et l'acétylCoA est déversé dans la circulation sous forme de corps cétoniques. La cétogénèse semble être parallèle au taux de la gluconéogénèse. L'utilisation préférentielle de l'oxalo-acétate par la PEP carboxykinase, ralentit la condensation de l'acétyl CoA avec le 2 oxo-acide pour former du citrate. Il y a donc formation de cétones (494).

12.1.2. Jeûne de longue durée

Le catabolisme protéique est maximum après 4 jours de jeûne puis diminue progressivement. L'élimination d'urée dans les urines décroît alors que celle d'ions ammonium augmente. Ce ralentissement du catabolisme protéique correspond à une nouvelle adaptation de

l'organisme. Lorsque la durée du jeûne augmente, les corps cétoniques et en particulier le B hydroxybutyrate et l'acétoacétate remplacent le glucose comme source d'énergie pour le cerveau. La gluconéogénèse hépatique tend alors à décroître jusqu'à fournir 45 g de glucose par jour au lieu de 180 g chez l'homme normal. Par contre les reins continuent à synthétiser 40 g de glucose par jour à partir des amino acides. Les résidus déaminés et déamidés sont incorporés dans le glucose. Les groupements aminés et amides sont transformés en ammoniacque (353). Le niveau de l'alanine plasmatique serait le meilleur indice de la gluconéogénèse hépatique.

L'insuline apparaît comme le facteur le plus déterminant dans le contrôle de la mobilisation énergétique et de l'homéostasie au cours du jeûne. La sécrétion d'insuline est stimulée non seulement par les glucides mais également par les acides gras, les acides aminés et les hormones.

Un accroissement physiologique de l'insuline sanguine par un apport de glucose, inhibe la libération d'acides aminés au niveau des muscles, et celle des acides gras libres à partir du tissu adipeux (66).

Il semble également que le glucagon puisse jouer un rôle important en stimulant l'activité de la PEP carboxykinase et probablement celle des transaminases. Il y a formation en effet, d'acide aspartique et utilisation d'acide 2 oxoglutarique dans le foie de rat perfusé par des solutions contenant les précurseurs de la gluconéogénèse et le glucagon (13, 159).

12.1.3. "Enzymes clés" de la gluconéogénèse. Leur localisation chez le rat et le cobaye

La séquence des réactions constituant la gluconéogénèse n'est pas l'inverse de la glycogénolyse. Trois réactions sont fortement exothermiques et constituent donc des barrières énergétiques. Elles doivent être contournées par des systèmes enzymatiques spécifiques : les enzymes clés de la néoglucogénèse (83, 159) qui permettent :

- . la phosphorylation du pyruvate en phosphoenolpyruvate
- . l'hydrolyse du fructose 1-6 diphosphate en fructose 6 phosphate par la fructose 1-6 diphosphatase
- . l'hydrolyse du glucose 6 phosphate en glucose par la glucose 6 phosphatase
- . la synthèse du glycogène

La première étape est la plus complexe, nécessitant la carboxylation préalable du pyruvate en oxaloacétate par la pyruvate carboxylase. Cette enzyme est activée par l'acétyl CoA. La transformation de l'oxaloacétate en phosphoénolpyruvate est catalysée par la PEP carboxykinase (471, 506).

Deux équivalents de nucléotide triphosphate sont requis, donc la réaction est exothermique et ne présente plus de barrière énergétique. (L'hydrolyse du PEP libère 12,8 kcal/mole ; celle de deux équivalents d'ATP 14 kcal/mole) (83).

La pyruvate carboxylase et la PEP carboxykinase ont une activité très élevée dans le foie et le rein et les Km pour leurs substrats respectifs sont bien inférieurs aux concentrations intracellulaires de ces substrats.

La pyruvate carboxylase est localisée exclusivement dans la mitochondrie (83, 289, 444). D'après MARCO (288) son activité dans le cytoplasme de la cellule ne dépasse pas 10 à 15 % de l'activité totale (289). La PEP carboxykinase par contre a une double localisation, mitochondriale et cytoplasmique, variable avec les espèces animales. Elle est essentiellement cytoplasmique chez le rat, la souris et le hamster, le lapin, mitochondriale chez le cobaye, l'homme, le pigeon, le mouton (110, 166, 167). Nous avons comparé dans le tableau suivant, la répartition des deux enzymes dans le foie de rat, de cobaye et chez l'homme (445).

		Rat	Cobaye	Homme
Pyruvate carboxylase	Mitochondries	+	+	+
Phosphoenol pyruvate carboxykinase	Mitochondries	0	+	+
	Cytoplasme	+	+	+

Or l'acide oxaloacétique peut difficilement traverser la membrane mitochondriale (177, 194, 195, 251, 434). Son transport est assuré par le cycle de l'aspartate malate sous la dépendance de la GOT et de la MDH (figure 3) (37, 72, 307). Toutefois, ces deux enzymes ne font pas partie des "enzymes clés" de la gluconéogenèse.

La localisation différente de la PEP carboxykinase selon ces animaux, donne lieu à des différences dans les réponses métaboliques au stress gluconéogénique. Nous avons pris comme exemples le cobaye et le rat.

L'activité des "enzymes clés" de la gluconéogénèse est plus faible chez le cobaye que chez le rat, sauf celle de la PEP carboxykinase. L'activité de cette enzyme ne varie pas après un jeûne de 48 heures chez le cobaye, alors qu'elle est augmentée chez le rat. Par contre, l'activité de la pyruvate carboxylase augmente chez les deux espèces (444, 501, 506).

L'efficacité des précurseurs varie également d'une espèce animale à l'autre. La vitesse de formation du glucose à partir de l'acide lactique et de l'acide pyruvique est plus élevée chez le cobaye (444). Elle est identique dans les deux espèces à partir de l'alanine, l'acide oxaloacétique et l'acide malique et plus faible à partir du fructose chez le cobaye (166).

Il est probable enfin que la localisation de la pyruvate carboxylase et de la PEP carboxykinase dans la cellule, soit à l'origine des différences observées dans le potentiel rédox intra-mitochondrial et intra cytoplasmique.

Ce potentiel a essentiellement pour but de maintenir l'état réducteur du cytosol pour permettre la suite des réactions inverses de la glycolyse et éviter l'oxydation du glucose formé (250).

Chez le cobaye, le rapport NAD/NADH dans la mitochondrie est multiplié par quatre au cours du jeûne. Contrairement au rat, le cobaye a un potentiel rédox intramitochondrial élevé dû à une oxydation plus élevée du NADH^+ en NAD^+ . La concentration globale d'acide malique et d'acide oxaloacétique hépatique décroît faiblement au cours d'un jeûne de 48 à 96 heures. En fait, la concentration en acide oxaloacétique intramitochondrial est multipliée par huit alors qu'elle diminue dans les mêmes proportions dans le cytosol. Cette augmentation correspond à une variation du potentiel rédox en faveur de l'oxydation des nucléotides.

Le potentiel rédox dans le cytosol est plus bas chez le cobaye que chez le rat. Il est stable au cours du jeûne chez le cobaye alors qu'il diminue progressivement chez le rat (444).

Chez le cobaye, la synthèse du PEP est intramitochondriale. La concentration en substrats de la gluconéogénèse et en oxaloacétate dans le cytosol est inférieure au K_m de la PEP carboxykinase (177, 444). Le PEP pourrait être alors transporté dans le cytosol pour suivre les étapes ultérieures de la gluconéogénèse. Le mécanisme exact n'est pas encore connu.

Dans le foie de rat par contre, cette synthèse est intracytoplasmique. 99 % de l'acide oxaloacétique sont extramitochondriaux (699). Elle est favorisée par un transfert dans le cytoplasme d'acide malique. La synthèse d'acide oxaloacétique à partir du malate fournit les ions H^+ nécessaires à certaines étapes de la gluconéogénèse en particulier à la transformation du phosphoglycéraldéhyde en triose phosphate (591).

D'après les travaux de SHRAGO et LARDY (434) seules les enzymes cytoplasmiques du foie de rat seraient capables de s'adapter à la gluconéogénèse.

Selon EXTON (133) la gluconéogénèse serait virtuellement indépendante du potentiel redox NADH/NAD extramitochondrial car le foie aurait un grand pouvoir de restauration du potentiel redox à des valeurs normales.

Au cours de notre travail sur l'étude du mode d'action des biguanides hypoglycémiantes, nous avons induit la gluconéogénèse chez des rats, par un jeûne de 48 heures. Nous avons voulu établir au préalable, les valeurs de référence des différents paramètres biologiques étudiés, chez les animaux alimentés et à jeûn.

12.2. RESULTATS ET DISCUSSION

12.2.1. Glycémie

Après un jeûne de 48 heures, la glycémie est abaissée de 1,1 g à 0,79 g/l, soit de 28 % (tableau 32). Cette différence est statistiquement significative.

TABEAU XXXII : VALEURS DE LA GLYCEMIE CHEZ LES RATS ALIMENTES ET CHEZ LES RATS A JEUN PENDANT 48 HEURES

g/l	Rats alimentés	Rats à jeûn pendant 48 h
n	12	10
$\bar{m} \quad (+ \text{ } 1 \text{ s})$	$1,10 \pm 0,09$	$0,79 \pm 0,064$

Ces valeurs sont proches de celles obtenues par BURNS (62). FISCHER (145) observe une chute de la glycémie de 80 % en utilisant la méthode de dosage enzymatique du glucose.

12.2.2. Cations

Les niveaux des cations calcium et magnésium dans le foie sont très faibles.

Nous n'avons pas observé de variation du magnésium dans le foie de rat après un jeûne de 48 heures.

Les résultats sont légèrement plus dispersés après cette période de jeûne. La valeur moyenne obtenue chez les rats alimentés est de 108 ± 16 $\mu\text{g/g}$ de foie et de $107,50 \pm 20$ $\mu\text{g/g}$ de foie (tableau 33).

Contrairement au Ca^{2+} et au Mn^{2+} , le Mg^{2+} n'a pas d'effet sur la production du glucose dans les coupes de foie de rat à partir de différents substrats : alanine, pyruvate, lactate, sérine, glutamine (390).

Nous avons noté une chute d'environ 50 % de la concentration hépatique du calcium. La moyenne obtenue dans le foie de rats alimentés est de $8,40 \pm 2,50$ $\mu\text{g/g}$ de foie et seulement $4,50 \pm 1,80$ $\mu\text{g/g}$ de foie (tableau 33).

TABLEAU XXXIII : VALEURS DU CALCIUM, MAGNESIUM , DANS LE FOIE DE RATS ALIMENTES ET A JEUN PENDANT 48 HEURES
($\bar{m} \pm 1 s$)

Résultats rapportés à 1 g de foie	Rats alimentés (n = 12)	Rats à jeûn pendant 48 h (n = 10)
Calcium (μg)	$8,40 \pm 2,50$	$4,50 \pm 1,80$
Magnésium (μg)	$108,00 \pm 16,00$	$107,50 \pm 20,00$

12.2.3. Protéines

La concentration des protéines hépatiques est plus élevée chez le rat à jeûn pendant 48 heures (tableau 35). Elle est de 164 ± 34 mg/g de foie chez le rat alimenté et de 189 ± 48 mg/g de foie de rat à jeûn depuis 48 heures.

Nous avons observé en parallèle un poids du foie inférieur. Il est de 6 à 7 g après une période de jeûne de 48 heures alors que le foie de rats alimentés pèse de 11 à 13 g.

WIMHURST (501) et MARCO (289) signalent également une augmentation de la concentration en protéines du foie après une période de jeûne.

12.2.4. Acides aminés

Nous avons dosé les acides aminés dans le premier surnageant des homogénats de foie :

- . à jeûn depuis 14 heures
- . à jeûn depuis 48 heures

L'acide aspartique, l'acide glutamique, la glycine et la leucine sont à des taux plus faibles après un jeûne de 48 heures qu'après une mise à jeûn de 14 heures (figures 27 et 28).

Le pool des acides aminés autres que l'alanine, augmente dans le foie de rat après un jeûne de 48 heures (62). Toutefois WILLIAMSON (499) n'observe pas de variation après un jeûne de 48 heures. SARKAR (399) quant à lui, constate une diminution de l'acide aspartique, de la thréonine et de la sérine. Nous avons observé cependant une chute importante de la concentration en alanine dans le foie de rats à jeûn 48 heures ce qui rejoint les résultats publiés par SARKAR (398), BURNS (62) et WILLIAMSON (499) chez le rat, et ceux de CAHILL (66) chez l'homme (figure 28).

L'alanine constitue le principal amino acide utilisé par le foie pour la gluconéogénèse.

Il est libéré surtout par le muscle. Cette libération diminue lorsque le jeûne se prolonge. Il est probable que l'éthanol ait un effet semblable (254). Le contrôle du mécanisme n'est pas connu, mais il est possible que l'alanine joue un rôle plus important que le transfert de précurseur glucogénique du muscle vers le foie. Il pourrait aussi servir à transporter l'ammoniaque par fixation sur le pyruvate. Ainsi un cycle glucose-alanine-glucose pourrait être utilisé dans le transport de l'ammoniaque de la périphérie au foie, de même que le cycle glucose-lactate-glucose (cycle de Cori) est utilisé pour le transfert de l'acide lactique. Ce cycle pourrait aussi, comme le cycle de Cori, transporter de l'énergie dérivée des graisses à la périphérie, mais plus efficacement car le passage du glucose au pyruvate et à l'alanine fournit plus d'énergie que le passage du glucose au lactate (66).

La vitesse d'incorporation de l'alanine dans le glucose sanguin est de l'ordre de 2 à 3 mn (3). Il en est de même pour d'autres précurseurs tels que les acides glutamique et aspartique et la sérine. La gluconéogénèse est plus lente à partir de la glutamine, du glycolle et de l'histidine. En fait, seule une faible proportion de ces acides aminés est utilisée pour la gluconéogénèse, même

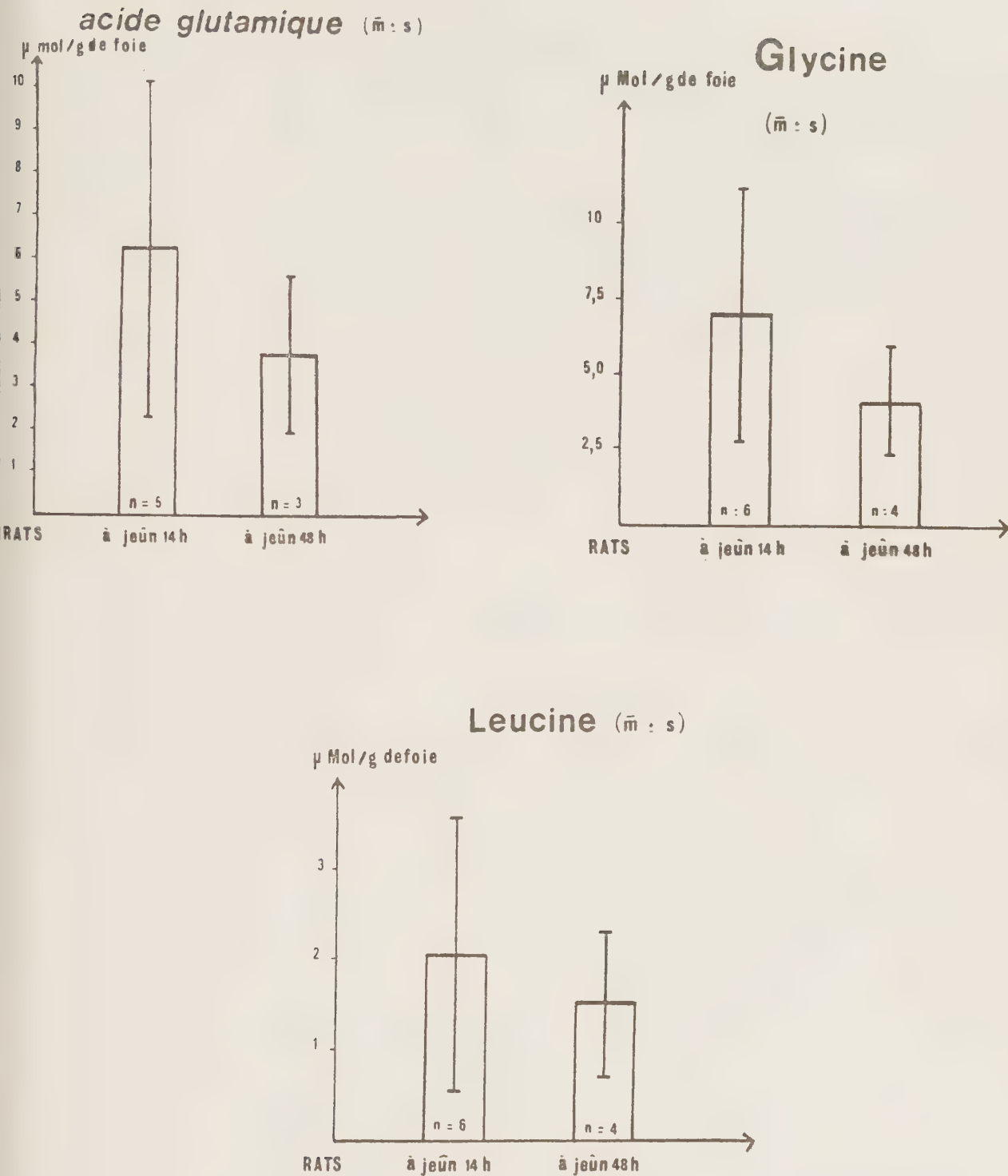


Figure 27 : Valeurs de l'acide glutamique, de la glycine et de la leucine dans le foie de rats à jeûn pendant 14 heures ou 48 heures.

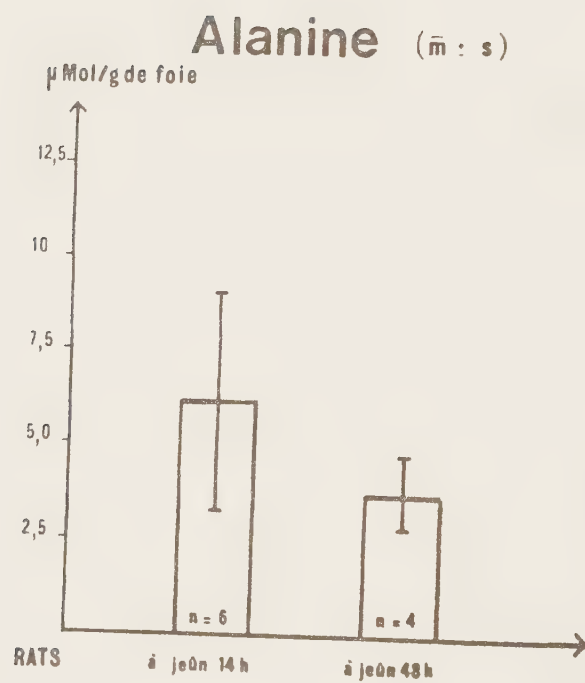
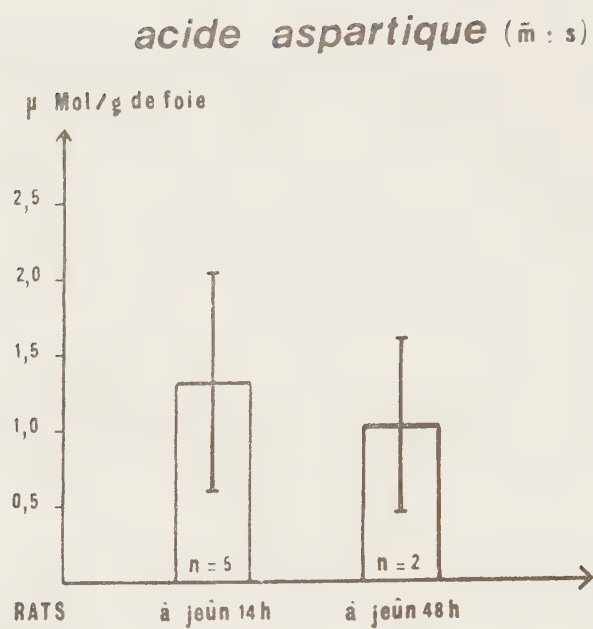


Figure 28 : Valeurs de l'acide aspartique et de l'alanine dans le foie de rats à jeûn pendant 14 heures ou 48 heures.

à des concentrations plasmatiques élevées. En revanche, l'utilisation de l'alanine et de la sérine est proportionnelle à leur niveau dans le plasma (3).

La divergence de nos résultats avec ceux cités dans la littérature doit être due principalement au nombre très réduit de nos dosages effectués sur les rats à jeûn 48 heures. D'autre part, nous utilisons des rats de souche différente et d'un poids plus élevé. Or la concentration des acides aminés dans le foie de rat varie avec l'âge donc avec le poids de l'animal (508).

12.2.5. Acide lactique

Nous avons observé une chute de 40 % de la concentration en acide lactique dans le foie de rats après un jeûne de 48 heures (tableau 34).

TABEAU XXXIV : VALEURS DE L'ACIDE LACTIQUE DANS LE FOIE DE RATS ALIMENTES ET A JEUN PENDANT 48 HEURES ($\bar{m} \pm 1 s$)

Valeurs rapportées à 1 g de foie	Rats alimentés (n = 12)	Rats à jeûn pendant 48 h (n = 10)
Acide lactique (μM)	$7,55 \pm 0,96$	$3,1 \pm 0,38$

Chez les rats alimentés, nous avons obtenu une concentration de $7,5 \pm 1,0 \mu M/g$ de foie.

Elle n'est que de $3,1 \pm 0,4 \mu M/g$ de foie après un jeûne de 48 heures.

L'acide lactique a pour origine les tissus dans lesquels la glycolyse est prépondérante : muscle strié, rein, érythrocytes, leucocytes.

Chez l'homme sain, 66 % du turn over du glucose seraient orientés vers la production de lactate, dont 15 % seulement sont transformés en glucose (cycle de Cori).

Pendant le jeûne, la conversion du glucose en lactate, diminue au profit des corps cétoniques et des acides gras. Inversement la conversion du lactate en glucose serait accélérée.

La stabilité de la lactacidémie suppose d'autres sources de lactate que le glucose, probablement des acides aminés (253).

La gluconéogénèse à partir du lactate dans le foie de rat perfusé est stimulée par la présence d'acides gras à chaîne longue ou moyenne (444) de glucagon et des catécholamines activées par l'AMP cyclique (13, 131, 132, 133). Il faut remarquer une fois encore que les concentrations élevées, utilisées pour la perfusion, sont peu compatibles avec un état physiologique (131).

La concentration d'acide lactique dans le foie de rat est abaissée après un jeûne de 48 heures (499). Nous avons également observé cette chute.

Par contre, STORMER (457) observe une augmentation après un jeûne court de 12 heures.

Nos résultats sont cependant nettement plus élevés par rapport à ceux rapportés par WILLIAMSON (499), STORMER (457), BARON (25) et HEMS (198).

Nos prélèvements tissulaires ne sont pas effectués dans les conditions décrites par KREBS (250) et HEMS (198). Selon ces auteurs, la pression d'oxygène dans le foie ne varie pas de façon sensible dans un intervalle de 20 secondes suivant l'arrêt de la circulation sanguine. Pour réussir cette performance technique, les vertèbres cervicales de l'animal sont disloquées par des ciseaux. Le rat est ainsi plongé dans un état végétatif qui permet de prélever rapidement le foie normalement irrigué. On clampe rapidement le foie avec des pinces refroidies par l'azote liquide. Le foie est alors prélevé dans un intervalle de temps n'excédant pas 10 secondes.

BURCH (61) et HEMS (198) ont montré ainsi une augmentation progressive de la concentration de l'acide lactique dans le foie de rat, en fonction de la durée d'ischémie. Le niveau en est multiplié par 3, après une minute seulement !

12.2.6. Activités enzymatiques de la GOT et de la MDH

Les activités de la GOT et de la MDH sont plus élevées après un jeûne de 48 heures.

L'activité de la GOT est de $176,7 \pm 22$ U/g de foie de rat alimenté et de $198,9 \pm 47$ U/g de foie de rat à jeûn pendant 48 heures. Celle de la MDH est respectivement de $667,5 \pm 66,5$ U/g de foie et de $757,5 \pm 91,5$ U/g de foie (tableau 35).

Les différences sont statistiquement significatives.

Les activités spécifiques des deux enzymes ne varient pas après une période de jeûne.

TABEAU XXXV : VALEURS DES PROTEINES, DE LA GOT ET DE LA MDH DANS LE FOIE DE RATS ALIMENTES ET DE RATS A JEUN PENDANT 48 HEURES

Résultats rapportés à 1 g de foie		Rats alimentés (n = 12)	Rats à jeûn pendant 48 h (n = 10)
Protéines (mg)		164 $\pm$ 34	189 $\pm$ 48
GOT	Activité enzymatique (U.I. à 30°C)	176,70 ($\pm$ 22)	198,90 ($\pm$ 47,00)
	Activité spécifique	1119 ($\pm$ 280)	1079 ($\pm$ 201)
MDH	Activité enzymatique (U.I. à 30°C)	667,50 ($\pm$ 66,50)	757,50 ($\pm$ 91,50)
	Activité spécifique	4250 ($\pm$ 1135)	4191 ($\pm$ 873)

La GOT et la MDH sont indirectement impliquées dans la voie de la gluconéogénèse. En effet, les réactions de transamination sont intimement associées au métabolisme des amino-acides, tant dans la phase anabolique que catabolique.

L'activité de la GOT hépatique par exemple, augmente au cours des régimes carencés en protéines, ou, à l'opposé, au cours de régimes hyperprotidiques (35, 59, 73, 153, 154, 240, 243, 260, 486).

En association avec d'autres systèmes enzymatiques, dont la MDH et les enzymes clés de la gluconéogénèse, la GOT contrôle le pool des amino-acides libres intra cellulaires et joue un rôle central dans le métabolisme de l'azote, ainsi que dans la régulation du volume cellulaire.

La GOT constitue ainsi un lien entre le métabolisme des glucides et celui des protéines (151).

Il ne faut pas oublier que son but final est d'éliminer l'azote de l'acide aspartique par l'intermédiaire du cycle de l'urée, alors que l'acide oxaloacétique formé est une source de radicaux carbonés pour le cycle de Krebs et pour la gluconéogénèse.

Au cours du jeûne, cette dernière fonction prédomine dans le cytoplasme. En association avec la MDH et la PEP carboxykinase, la GOT participe donc à la synthèse du PEP cytoplasmique.

Cependant, ANDERSON (12) et BERRY (37) rapportent que la GOT n'intervient que lorsque la gluconéogénèse est induite à partir de l'acide lactique. Elle n'est pas modifiée lorsque le précurseur est l'acide pyruvique.

Par contre, le cycle acide malique $\longrightarrow$ acide oxaloacétique, contrôlé par la MDH, est stimulé lorsque les substrats de la gluconéogénèse sont l'acide lactique ou l'acide pyruvique (37).

Les deux systèmes enzymatiques semblent être indépendants.

L'activation de la GOT ne serait donc pas un phénomène de compensation de l'inhibition de la MDH pour maintenir la gluconéogénèse à un niveau constant.

Le transport des substrats de la gluconéogénèse à travers la membrane mitochondriale est fonction du pouvoir réducteur du précurseur : acide pyruvique, acide lactique, acide malique, acides aminés (12, 133, 307, 445). Ainsi, le transport de l'acide aspartique ne prédomine sur celui de l'acide malique que lorsque le précurseur de la gluconéogénèse est à un état réducteur identique à celui du glucose, comme l'acide lactique.

Lorsque le substrat est plus oxydant que le glucose, comme l'acide pyruvique par exemple, les besoins en carbone et en ions H^+ sont comblés par le transport d'équivalents réducteurs dans le cytosol (acide malique, acide glutamique). Des équivalents oxydants (acide 2 oxoglutarique et aspartique) repassent dans la mitochondrie (12, 307). Les acides aminés glucoformateurs d'autre part induisent l'efflux de l'acide malique et de l'acide aspartique hors de la mitochondrie (12).

Il apparaît donc une certaine spécificité de ces deux enzymes vis-à-vis des précurseurs de la gluconéogénèse. Leur rôle exact dans la répartition de ces précurseurs entre le cytoplasme et la mitochondrie fait encore l'objet d'investigations.

Selon SHRAGO et LARDY (434), la MDH est augmentée au cours du diabète, mais pas du jeûne. Nous avons observé pour notre part une augmentation de 10 % de l'activité de cette enzyme après un jeûne de 48 heures. Mais nos mesures sont faites sur un broyat total en présence de Triton X 100 alors que SHRAGO et LARDY dosent les activités enzymatiques uniquement dans la fraction cytoplasmique.

Les résultats que nous avons obtenus correspondent par contre à ceux présentés par MARCO (289). Selon MARCO, l'activité de la MDH dans le foie de rat est augmentée après un jeûne depuis 48 heures, non seulement dans le cytoplasme mais aussi dans la mitochondrie.

COPENHAVER (88) a signalé, dès 1951, une augmentation de l'activité de la GOT dans le foie de rats, rendus diabétiques par l'alloxane. SHRAGO (434) et KLINGER (241) observent également cette activité, chez les rats diabétiques ou à jeûn. Pourtant, les niveaux de tous les substrats de la GOT sont plus faibles chez les rats traités par l'alloxane que chez les rats témoins, nourris. Le système enzymatique est toutefois équilibré et une chute du niveau de l'acide oxaloacétique est suivie de celle de l'acide aspartique.

Le rapport $\frac{\text{acide glutamique}}{\text{acide 2 oxoglutarique}}$ est constant (499).

Au cours de notre travail, nous avons mis en évidence par électrophorèse, un pourcentage plus faible de l'isoenzyme cytoplasmique de la GOT après un jeûne de 48 heures dans le foie de rats par rapport aux rats alimentés (tableau 36).

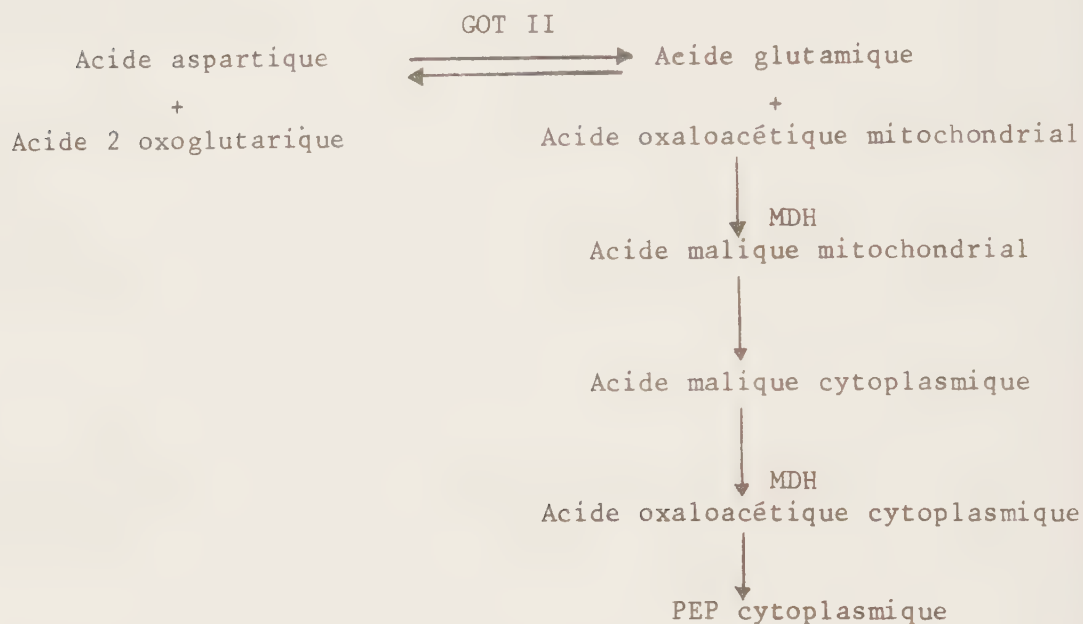
TABEAU XXXVI : VALEURS DE L'ISOENZYME CYTOPLASMIQUE DE LA GOT PAR ELECTROPHORESE SUR ACETATE DE CELLULOSE GELATINEUX DANS LE FOIE DE RATS ALIMENTES ET A JEUN PENDANT 48 HEURES ($\bar{m} \pm 1 s$)

	Rats alimentés (n = 10)	Rats à jeûn pendant 48 h (n = 12)
Isoenzyme cytoplasmique (%)	48 $\pm$ 6	34,5 $\pm$ 2,5

MARCO (289) observe une activité plus importante des activités de la GOT mitochondriale et cytoplasmique dans le foie de rats à jeûn pendant 48 heures par rapport aux rats alimentés. Mais cette augmentation est légèrement plus importante dans la phase cytoplasmique.

Selon MICHUDA, MARTINEZ-CARRION (315), l'activité de la GOT II paraît être contrôlée par les substrats ou inhibiteurs à 4C, alors que la GOT I l'est par ceux à 4 ou 5 carbones.

Les pools des intermédiaires tels que l'oxaloacétate ou le 2 oxoglutarate pourraient in vivo contrôler le sens des activités de la GOT mitochondriale dans l'un ou l'autre sens, l'oxaloacétate étant un "effecteur" plus actif de la forme mitochondriale.



Cette voie pourrait être inversée par la GOT et la MDH cytoplasmiques.

La répartition des isoenzymes de la GOT que nous avons obtenue chez les rats alimentés, est différente de celle relevée dans la littérature.

Alors que le pourcentage moyen de l'isoenzyme mitochondriale est de 52 % au cours de nos essais, il est de 75 à 92 % par des méthodes immunochimiques (342), chromatographiques (372) ou électrophorétiques sur gel d'amidon (408).

Par contre, après ultracentrifugation, elle n'est que de 59 % (422) à 65 % (372).

Il est possible qu'une partie des mitochondries soit lysée, quoique celles-ci soient moins fragiles que celles provenant d'animaux à jeûn.

12.2.7. Mesure de la respiration des mitochondries

Les mesures sont effectuées sur les mitochondries de foie de rats alimentés et de rats à jeûn pendant 48 heures.

Nous avons constaté que, dans le cas des mitochondries de foie de rats alimentés, le rapport $\frac{\text{ADP}}{\text{O}}$ de 2,24 est proche de celui observé par EASTABROOK (127) de 2 à 6. Il n'est que de 1,89 lorsque les mitochondries sont isolées à partir d'un foie de rat à jeûn pendant 20 heures. L'indice de contrôle respiratoire est également supérieur dans les mitochondries de foie de rats alimentés (tableau 37).

Ces résultats indiquent une fragilisation de la structure des mitochondries après une période de jeûne déjà signalée par WALTER et ANABITARTE (487).

TABEAU XXXVII : DIFFERENCES OBSERVEES DANS LA MESURE DE LA RESPIRATION DE FOIE DE RAT ALIMENTE ET A JEUN PENDANT 20 HEURES

Rat alimenté		Rat à jeûn pendant 20 heures	
$\frac{\text{ADP}}{\text{O}}$	$\frac{\text{y}}{\text{z}}$	$\frac{\text{ADP}}{\text{O}}$	$\frac{\text{y}}{\text{z}}$
2,24 (+ 0,25)	2,3 (+ 0,34)	1,89 (+ 0,13)	1,79 (+ 0,13)

Le potentiel rédox intracytoplasmique, donc la gluconéogénèse, pourrait être contrôlé par l'activité de la chaîne respiratoire. KREBS (250) remarque en effet que le rapport $\frac{\text{ATP}}{\text{ADP} \times \text{Pi}}$ diminue

au cours du jeûne ou du diabète, et le rapport $\frac{\text{NADH}}{\text{NAD}}$ intra-cytoplasmique augmente. Parallèlement, la gluconéogénèse est accrue.

Le niveau en ATP dans le cytoplasme doit être élevé puisque la gluconéogénèse nécessite 6 molécules d'ATP par molécule de glucose formé et 7 molécules d'ATP par molécule de glucose incorporé dans le glycogène.

Au cours du jeûne ou du diabète, le contenu en ATP du cytoplasme diminue alors que la concentration en ADP augmente en indiquant une gluconéogénèse accrue.

12.2.8. Conclusion

Ayant vérifié soigneusement dans la deuxième partie, tous les problèmes techniques de la séparation et du dosage de la GOT et de ses formes moléculaires multiples, nous connaissons parfaitement les limites de cette méthode. Nos résultats ont été présentés en tenant compte de cette dispersion, ce qui ne ressort pas dans de nombreux travaux publiés jusqu'à présent.

Avant d'aborder notre travail sur l'influence des biguanides hypoglycémiantes, nous avons étudié les variations biologiques dans le foie de rat dues à un jeûne de 48 heures.

Nous avons mis en évidence une baisse importante du calcium (46 %) du lactate (40 %), des acides aminés (alanine, glycocolle, acide aspartique, acide glutamique, leucine).

Nous avons dosé également la glycémie, Celle-ci est abaissée de 28 % après un jeûne de 48 heures.

Le magnésium ne varie pas. Par contre, les activités de la GOT et de la MDH, ainsi que la concentration en protéines du foie, augmentent au cours du jeûne. Les activités spécifiques des deux enzymes ne varient pas.

La modification de la répartition des isoenzymes de la GOT pourrait être un indice de la localisation différente des substrats de la gluconéogénèse dans la cellule pendant le jeûne, correspondant à une adaptation des systèmes enzymatiques.

CHAPITRE XIII

ETUDE IN VIVO CHEZ LE RAT

Nous avons abordé notre travail sur l'action des biguanides hypoglycémiantes sur la gluconéogénèse, en étudiant les variations biologiques in vivo, après un traitement par deux d'entre eux : le DMB et le DBI.

Pour ce faire, nous avons choisi de travailler sur le rat, plus sensible au DMB que le cobaye, bien qu'il soit moins sensible au DBI. Nous avons utilisé le foie qui est considéré comme l'organe "cible" des biguanides (64, 442). L'induction de la gluconéogénèse par le jeûne, nous a semblé préférable à une induction par l'hydrocortisone, employée en particulier par IPAKTCHI (218). En effet, ce corticoïde pourrait interférer avec l'action propre au biguanide. D'autre part, il augmente la taille des mitochondries dans le foie de rat et en diminue le nombre (192). La durée du jeûne est de 48 heures, avec injection des biguanides à intervalles réguliers, alors que MUNTONI (331), KRUGER (256), MURPHY (332), LYNGSOE (282) administrent les biguanides après des périodes de jeûne de 16 à 80 heures.

Le DMB et le DBI sont administrés pendant le jeûne de 48 heures, par injection intrapéritonéale, à raison de 700 mg/kg/48 heures pour le DMB et de 250 mg/kg/48 heures pour le DBI.

Le rythme des injections et les doses administrées sont détaillés dans le tableau suivant :

Temps	DMB (mg/kg)	DBI (mg/kg)
Zéro (mise à jeûn)	200	75
24 heures	200	75
36 heures	300	100

25 % des animaux ont succombé après la dernière injection de DMB bien que chaque dose soit inférieure à la DL 50 (500 mg/kg). Nous n'avons constaté aucun décès après traitement par le DBI alors que les doses sont proches et parfois supérieures à la DL 50, qui est de 88 mg/kg chez le rat à jeûn.

Les dosages enzymatiques et chimiques sont effectués sur les broyats de foies à l'Ultra Turrax dans la solution de saccharose 0,25 M - Tris 1 mM - Triton X 100 à 1 ‰ (voir page 107). Seuls les acides aminés sont dosés dans le premier surnageant des homogénats de foie au Potter Elvehjem, après élimination de la fraction nucléaire (voir page 116). La mesure des activités enzymatiques de la GOT et de la MDH est effectuée à 30°C.

Nous avons ainsi pu suivre dans le foie des rats traités soit par le DMB, soit par le DBI, les variations :

- de deux enzymes impliquées dans la gluconéogénèse :
GOT et MDH
- de certains substrats de la gluconéogénèse :
acides aminés et acide lactique
- des cations : calcium, magnésium
- des protéines

Nous avons complété cette étude par le dosage de la glycémie.

13.1. GLYCEMIE

13.1.1. Résultats

La valeur moyenne obtenue est de $0,69 \pm 0,27$ g/l chez les rats traités par le DMB. Elle est inférieure à celle des témoins à jeûn 48 heures (figure 29). Cette différence est significative.

Les valeurs basses que nous avons constatées peuvent être attribuées à trois résultats isolés, inférieurs à 0,40 g/l. Ils expliquent également la dispersion élevée de nos résultats.

La glycémie chez les rats traités au DBI est plus proche de celle des rats alimentés qui est respectivement de 1,10 g et 1,02 g. Elle est supérieure à celle des témoins à jeûn 48 heures (figure 29).

13.1.2. Discussion

Nos résultats montrent que le rat est plus sensible au DMB qu'au DBI. L'inefficacité de ce dernier composé chez le rat a déjà été signalée. (218, 445, 456).

Par contre, le cobaye est très sensible au DBI, et moins sensible au DMB.

Nous pensons que cette différence pourrait être due à la compartimentation variable selon ces animaux, de la PEP carboxykinase dans la cellule. Elle pourrait également être imputée au métabolisme des deux biguanides. Rappelons en effet que le DBI est hydroxylé dans le foie de rat, à une vitesse beaucoup plus grande que dans le foie de cobaye (213).

Le choix de notre méthode de dosage de la glycémie doit être remis en cause. En effet, cette méthode n'est pas spécifique du glucose. Une méthode de dosage spécifique du glucose à l'hexokinase ou à la glucokinase eût été préférable. Le manque de spécificité de la méthode à l'o. toluidine, pourrait expliquer les résultats élevés de la glycémie chez le rat traité par le DBI.

13.2. PROTEINES

13.2.1. Résultats

Après traitement par le DMB, la teneur en protéines atteint 206 ± 24 mg/g de foie alors qu'elle n'est que de 189 ± 48 mg/g de foie chez les rats témoins à jeûn 48 heures (figure 30).

D'après le test de KRUSKAL et WALLIS (257) la différence est significative. Nous avons également remarqué une différence sensible dans la taille du foie entre ces deux lots d'animaux. Le poids moyen du foie chez les rats traités par le DMB est de 8 g alors qu'il n'est que de 6,5 g chez les rats témoins.

La différence des concentrations en protéines obtenues chez les rats traités par le DBI par rapport aux témoins, n'est pas statistiquement significative.

Nous avons parfois observé chez certains animaux à jeûn traités par le DBI (jamais par le DMB) une concentration très faible en protéines que nous ne pouvons expliquer.

13.2.2. Discussion

Les différences statistiquement significatives doivent être interprétées avec prudence étant donné les variations du poids du foie et la petite taille de notre échantillon.

Cependant, les deux résultats, diminution du poids du foie et diminution des protéines chez les rats à jeûn pendant 48 heures, vont dans le même sens, une partie des protéines hépatiques étant également utilisée par la gluconéogénèse. Les valeurs supérieures du poids du foie et du taux des protéines, sont alors un argument pour une inhibition de la gluconéogénèse par les biguanides, du moins, par le DMB.

Glycémie

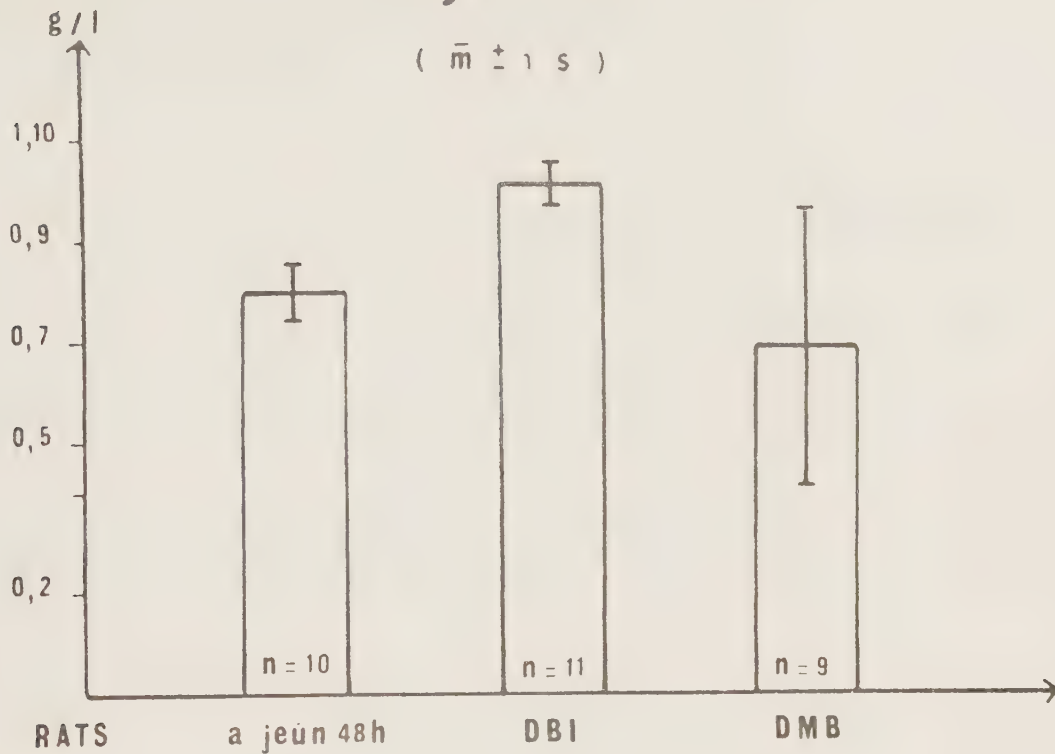


Figure 29 : Valeurs de la glycémie chez les rats témoins à jeûn pendant 48 heures, et chez les rats traités par le DBI (250 mg/kg/48 heures) et le DMB (700 mg/kg/48 heures).

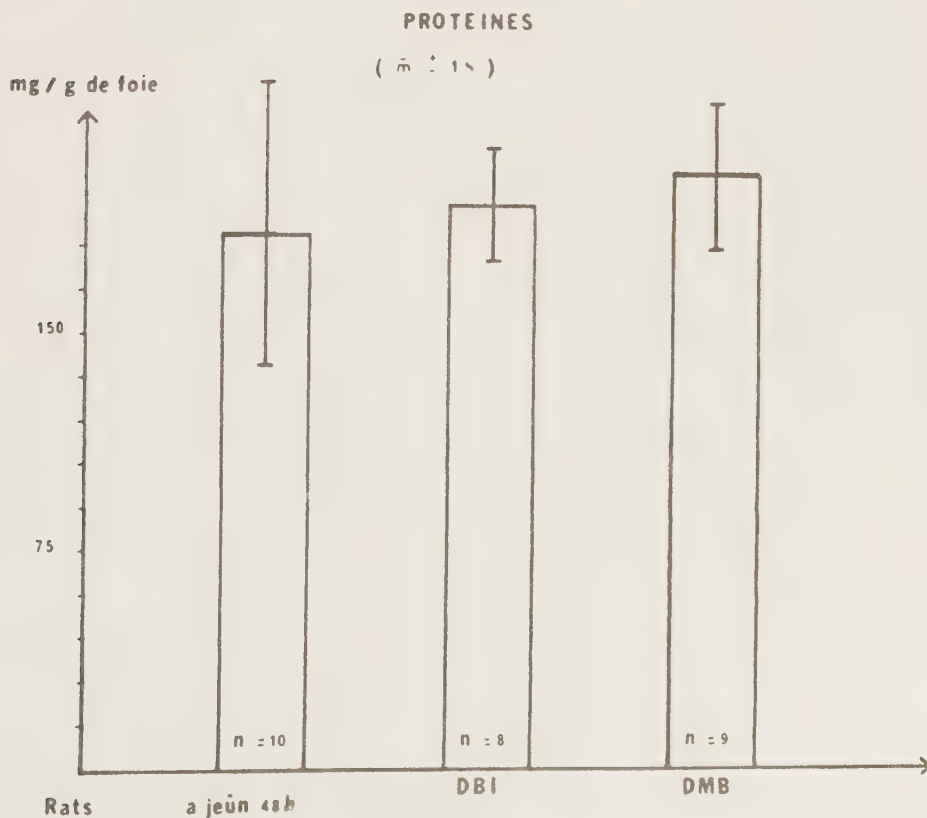


Figure 30 : Concentration en protéines dans le foie de rats témoins à jeûn, pendant 48 heures, et de rats traités par le DBI (250 mg/kg/48 heures) et le DMB (700 mg/kg/48 heures).

13.3. ACTIVITES ENZYMATIQUES DE LA GOT ET DE LA MDH

13.3.1. Résultats

L'activité enzymatique de la GOT par gramme de foie est plus élevée après un traitement par les biguanides hypoglycémiantes qu'après un jeûne de 48 heures.

Après injection de DMB, l'activité enzymatique moyenne calculée sur un lot de 9 rats est de $237 \pm 45,5$ UI/g de foie. Elle est de $236 \pm 32,50$ UI/g de foie après injection de DBI (figure 31).

L'activité spécifique de la GOT est supérieure à celle du témoin à jeûn après traitement par le DBI alors qu'elle n'est pas modifiée par le DMB (tableau 38).

TABLERAU XXXVIII : ACTIVITE SPECIFIQUE DE LA GOT ET DE LA MDH DANS LE FOIE DE RATS TEMOINS A JEUN PENDANT 48 HEURES ET DE RATS TRAITES PAR LE DBI (250 mg/kg/48 h) ET LE DMB (700 mg/kg/48 h).

	GOT	MDH
Rats témoins (n = 10)	1079 ($\pm$ 201)	4191 ($\pm$ 873)
Rats traités par le DMB (n = 9)	1124 ($\pm$ 162)	3984 ($\pm$ 612)
Rats traités par le DBI (n = 8)	1220 ($\pm$ 147)	3710 ($\pm$ 985)

La répartition des isoenzymes varie également avec le biguanide administré.

Après injection de DBI, le pourcentage d'isoenzyme mitochondrial est abaissé de 26 % par rapport aux témoins. La chute n'est que de 11 % après administration de DMB (figure 32).

ACTIVITE ENZYMATIQUE
(U / g de foie)

GOT

($\bar{m} \pm 1 \sigma$)

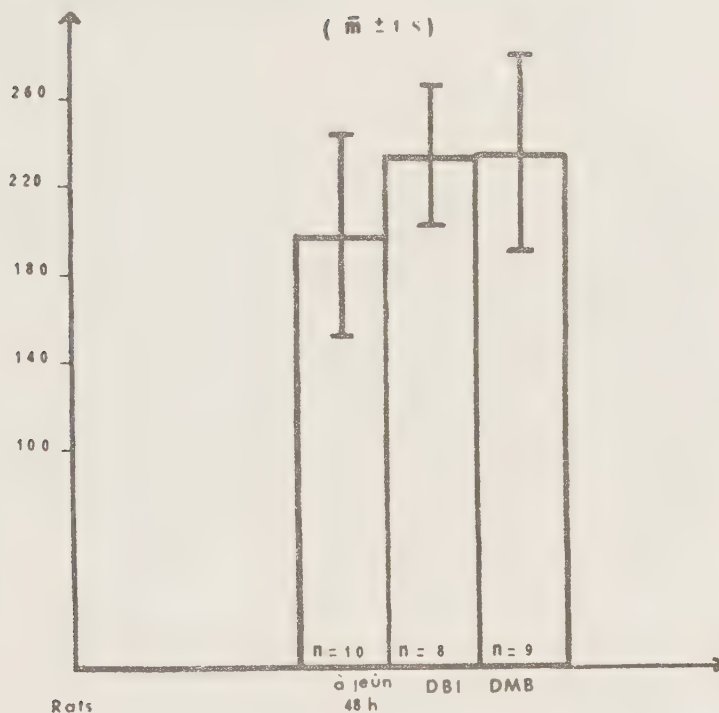


Figure 31 : Activité enzymatique de la GOT dans le foie de rats témoins à jeûn pendant 48 heures et de rats traités par le DBI (250 mg/kg/48 heures) et le DMB (700 mg/kg/48 heures).

ISOENZYMES DE LA GOT

($\bar{m} \pm S$)

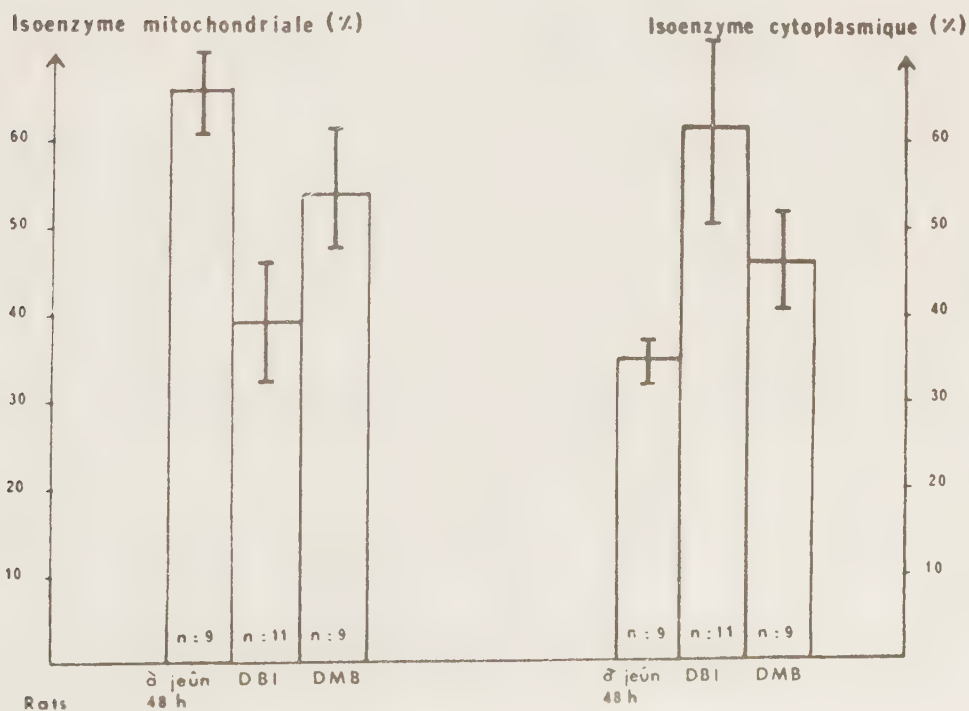


Figure 32 : Isoenzymes de la GOT dans le foie de rats témoins à jeûn pendant 48 heures, et de rats traités par le DBI (250 mg/kg/48 heures) et le DMB (700 mg/kg/48 heures).

Nous avons pu constater, d'autre part, une activité plus élevée de la MDH, après traitement par le DMB. L'activité moyenne est de $814 \pm 87,0$ UI/g de foie. Par contre, après des injections répétées de DBI, l'activité de la MDH est inférieure à celle des témoins, soit $716,50 \pm 57,0$ UI/g de foie (figure 33).

Toutefois, quel que soit le biguanide injecté, l'activité spécifique de la MDH ne varie pas de façon statistiquement significative (tableau 38). Dans le cas du DMB, nous avons obtenu une valeur moyenne de 3984 ± 612 UI/g de protéines et de 3710 ± 985 UI/g de protéines dans le cas du DBI.

Nous n'avons pas séparé les isoenzymes de la MDH.

13.3.2. Discussion

Nous constatons donc des variations de l'activité de la GOT et de la répartition de ses isoenzymes.

Peu de travaux sont consacrés à l'action des biguanides sur les protéines enzymatiques. Seuls, PATRICK (361) et HAECKEL (18) évoquent une inhibition possible de la fructose 1-6 diphosphate et de la glucose 6 phosphatase par une concentration plus élevée de l'AMP tissulaire. L'un des modes d'action possible des biguanides, serait donc là encore un effet par l'intermédiaire des nucléotides adényliques.

D'autre part, au cours de leurs travaux, MEYER (311, 312) et IPAKTCHI (218) ont mis en évidence un blocage spécifique de la transformation de l'acide pyruvique en acide oxaloacétique par le DMB, alors que le DBI inhibe in vitro, la synthèse du glucose à partir de l'acide glutamique, de l'acide aspartique et de l'acide oxaloacétique. Il est donc possible d'admettre avec IPAKTCHI, une action du DBI sur la transformation des acides aminés en 2 oxo acides, donc sur la transamination. Nos résultats seraient en faveur d'une activation de la GOT, non seulement par injection de DMB, mais également de DBI.

Cependant, l'effet de ces deux biguanides est différent puisque

- l'activité spécifique et le pourcentage d'isoenzymes mitochondriales de la GOT varient avec le biguanide injecté.
- l'activité de la MDH est peu modifiée après traitement par le DMB et par le DBI.

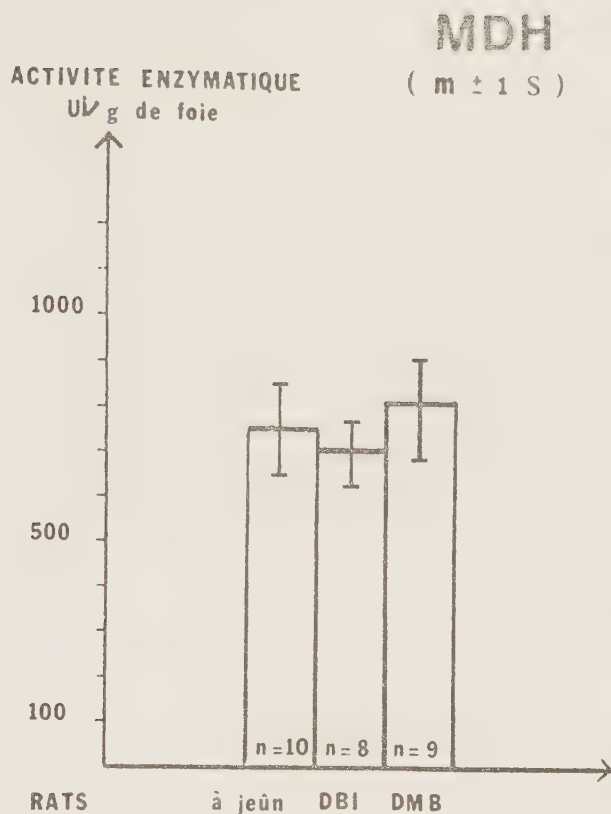


Figure 33 : Activité enzymatique de la MDH dans le foie de rats témoins à jeûn, pendant 48 heures et de rats traités par le DBI (250 mg/kg/48 heures) et le DMB (700 mg/kg/48 heures).

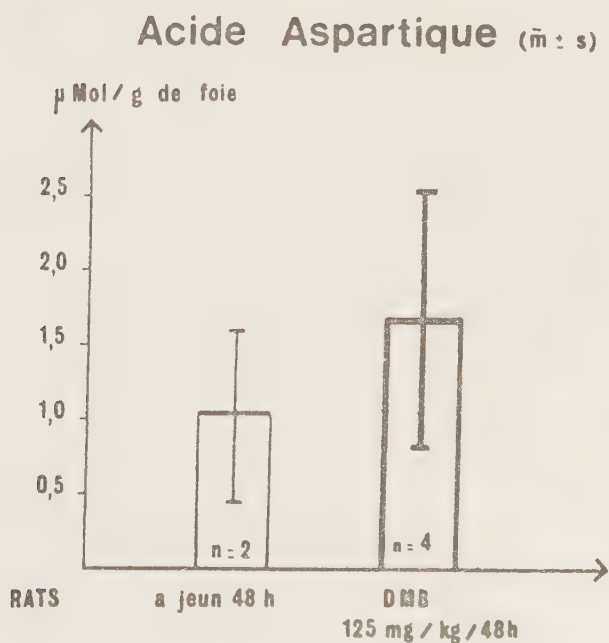


Figure 34 : Concentration en acide aspartique dans le foie de rats témoins à jeûn pendant 48 heures et de rats traités par 125 mg/kg/48 heures de DMB.

L'activité plus élevée de la GOT après traitement par le DMB correspond à une concentration plus élevée en protéines dans le foie des rats traités. Les activités spécifiques de ces deux enzymes n'étant pas modifiées, il est possible que le DMB stimule leur synthèse. Nous n'avons pas vérifié cette hypothèse; elle nous paraît cependant improbable. Par contre, ce biguanide pourrait exercer un effet "protecteur" contre la dégradation des protéines, et par conséquent contre la libération des amino acides utilisables par la gluconéogénèse.

L'augmentation de l'activité de la GOT et de la MDH pourrait également s'expliquer :

- soit par une quantité de substrats de la gluconéogénèse plus importante, ce que nous avons tenté de vérifier en les dosant.
- soit par une modification du passage des substrats à travers la membrane mitochondriale correspondant à la répartition différente des isoenzymes de la GOT dans la cellule.

Ces deux derniers mécanismes d'action pourraient s'appliquer également au DBI.

Il est également possible que l'effet hypoglycémiant des biguanides, puisse être attribué à l'inhibition de l'incorporation de l'acide oxaloacétique formé par transamination. En effet, YOSHIKAWA (509) a montré les propriétés hypoglycémiantes de ce 2^o oxo acide, chez le rat rendu diabétique par l'alloxane et chez l'homme diabétique.

13.4. ACIDES AMINES

13.4.1. Résultats

Au cours de ces essais, nous n'avons utilisé que le DMB à des doses de 125 mg/kg/48 heures, inférieures aux doses habituelles. Dans ces conditions, l'acide glutamique, l'acide aspartique, l'alanine, la glycine et la leucine, sont à des concentrations supérieures à celles obtenues sur les témoins à jeûn pendant 48 heures (figures 34, 35 et 36).

13.4.2. Discussion

Chez le rat, l'étude de l'effet des biguanides sur l'incorporation des acides aminés dans la voie de la gluconéogénèse a été effectuée in vivo et in vitro par MEYER (311, 312) et IPAKTCI (218). Ces auteurs ont pu mettre en évidence une inhibition par le DMB de la gluconéogénèse induite in vivo, par injection de l'alanine à des rats à jeûn depuis 24 heures. L'inhibition par le DBI est supérieure à celle obtenue avec le DMB.

Il semble qu'il s'agisse d'un blocage de la synthèse du glycogène plutôt qu'une glycolyse exagérée. Les biguanides ne produisent pas en effet, une hypoglycémie comparable à celle observée après une stimulation de la phosphorylase du glycogène. De plus, la formation de glucose marqué est diminuée après traitement par les biguanides, ce qui est contraire à un effet sur la glycolyse.

Ces résultats in vivo sont confirmés in vitro sur des coupes de rein de rat. L'inhibition de la gluconéogénèse à partir des acides aminés à trois et quatre carbones (L.glutamate, L.alanine, L.aspartate) est plus marquée en présence de DBI que de DMB.

Utilisant également l'alanine comme substrat, TOEWS (462) n'observe pas de variations du niveau du pyruvate, phosphoenolpyruvate, 2 phosphoglycérate, fructose 6 phosphate et glucose 6 phosphate lorsque le foie de rat est perfusé par le DBI. La concentration en acide 2 oxoglutarique est augmentée. Selon TOEWS (462), le DBI inhiberait le cycle tricarboxylique en bloquant la transformation de l'acétyl CoA en citrate.

Chez le cobaye, les deux biguanides inhibent fortement in vivo la gluconéogénèse à partir de L.alanine chez l'animal à jeûn depuis 24 à 36 heures et traité par le cortisol (218). Par contre, seul le DBI inhibe in vivo, la synthèse du glycogène à partir d'acide aspartique. Ces effets s'accompagnent d'une augmentation des acides aminés dans le plasma (218).

Cette dernière étude n'a pas été effectuée sur le rat.

Il apparaît donc là encore, une différence d'action des biguanides

- selon l'animal
- selon le point d'impact dans la chaîne métabolique correspondant à la gluconéogénèse

Au cours d'une première série d'expérimentations restant donc à confirmer, nous avons constaté une augmentation des acides aminés hépatiques chez le rat traité par le DMB, en particulier l'alanine, l'acide aspartique et l'acide glutamique.

Nos résultats sembleraient confirmer une inhibition de la gluconéogénèse à partir de ces amino-acides, pouvant entraîner une activité accrue de la GOT.

Après avoir vérifié l'effet des biguanides sur le niveau des acides aminés hépatiques, nous avons suivi les variations de l'acide lactique, un autre substrat de la gluconéogénèse.

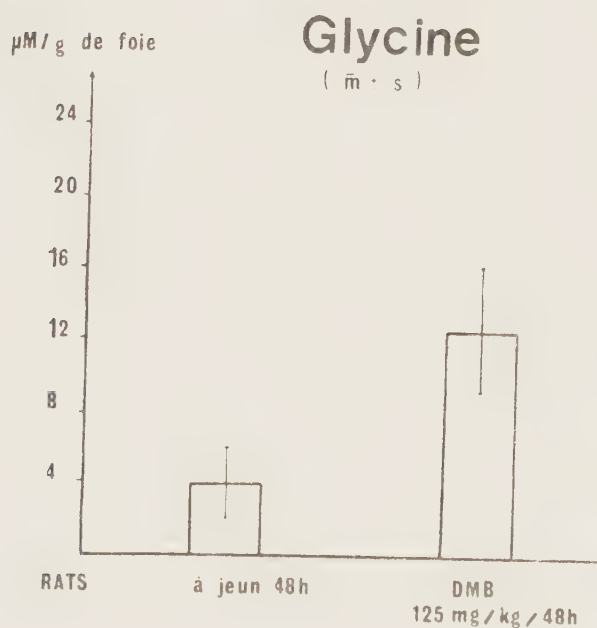
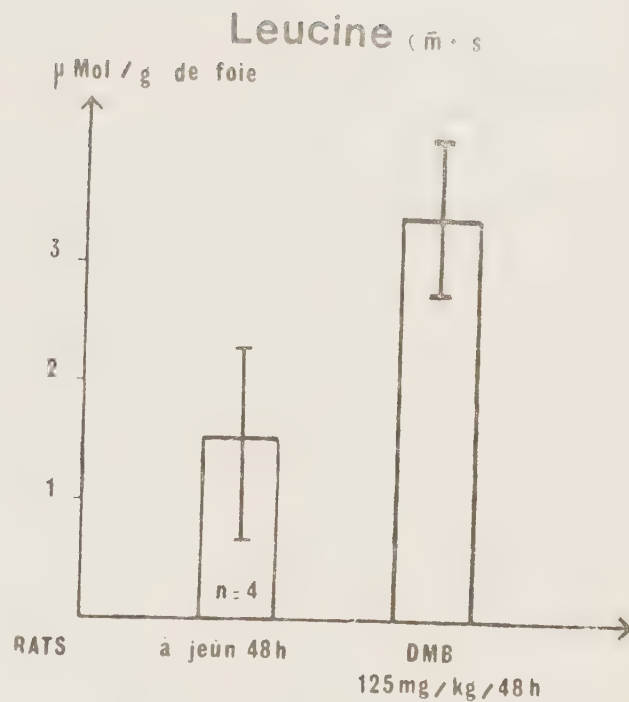
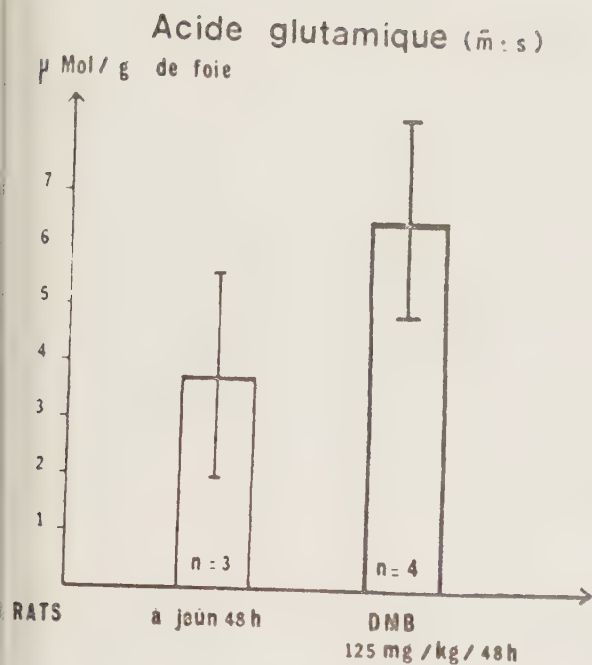


Figure 35 : Concentration en acide glutamique, glycine et leucine dans le foie de rats témoins à jeûn pendant 48 heures et de rats traités par 125 mg/kg/48 heures de DMB.

13.5. ACIDE LACTIQUE

13.5.1. Résultats

Quel que soit le biguanide administré, la concentration en acide lactique dans le foie est supérieure à celle observée dans le foie des rats témoins, à jeûn pendant 48 heures. Elle est en moyenne de $4,20 \pm 0,90 \mu\text{M/g}$ de foie après injection de DMB et de $6,20 \pm 0,80 \mu\text{M/g}$ de foie après traitement par le DBI alors que la teneur en acide lactique dans le foie de rats à jeûn pendant 48 heures n'est que de $3,00 \pm 0,40 \mu\text{M/g}$ de foie (figure 37).

13.5.2. Discussion

Si le DMB ne modifie pas la concentration du lactate sanguin (104, 309), l'administration de DBI par contre, provoque parfois une hyperlactacidémie chez les sujets diabétiques (40, 104, 119, 227, 309, 397, 452, 470).

Au cours de nos essais sur le rat, nous avons montré que les deux biguanides augmentaient le niveau de l'acide lactique dans le foie. Il est donc probable que les mécanismes d'action des biguanides chez l'homme et chez le rat, soient différents.

Chez l'homme, la responsabilité directe du DBI est encore discutée.

Dans une expérimentation effectuée sur des sujets diabétiques équilibrés et des obèses ayant absorbé des doses équivalentes de DBI, DEBRY (104, 105) met en évidence l'effet hyperlactacidémiant de ce médicament. Cette action est plus marquée chez les sujets à jeûn. La dispersion des résultats, beaucoup plus grande qu'avec le DMB, pourrait avoir pour origine des sensibilités individuelles variables selon les sujets traités. Il semblerait que le DBI ne provoque pas par lui-même une acidose lactique mais constitue un facteur aggravant secondaire.

Ainsi, certaines valeurs élevées peuvent être dues à des affections secondaires telles que les états de choc, la septicémie, l'hypertension, le collapsus, les troubles cardiaques, rénaux, neurologiques ou endocriniens, l'effort, l'alcoolisme (29, 40, 99, 119, 309, 452).

Ces observations ne sont pas accompagnées en général d'une étude témoin, en l'absence de biguanide ou d'insuline. L'interprétation des résultats est dès lors difficile, puisque la preuve n'est pas faite d'une lactacidémie normale en dehors de tout traitement.

Il est possible que ces états pathologiques favorisent l'accumulation des biguanides dans les tissus et provoquent une inhibition de la respiration cellulaire par un ralentissement de la circulation sanguine (31).

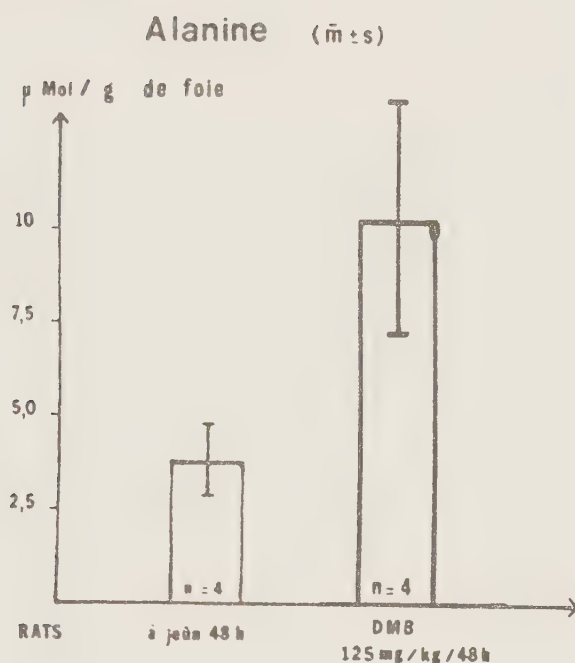


Figure 36 : Concentrations en alanine dans le foie de rats à jeûn pendant 48 heures, et de rats traités par le DBI (250 mg/kg/48 heures) et le DMB (700 mg/kg/48 heures).

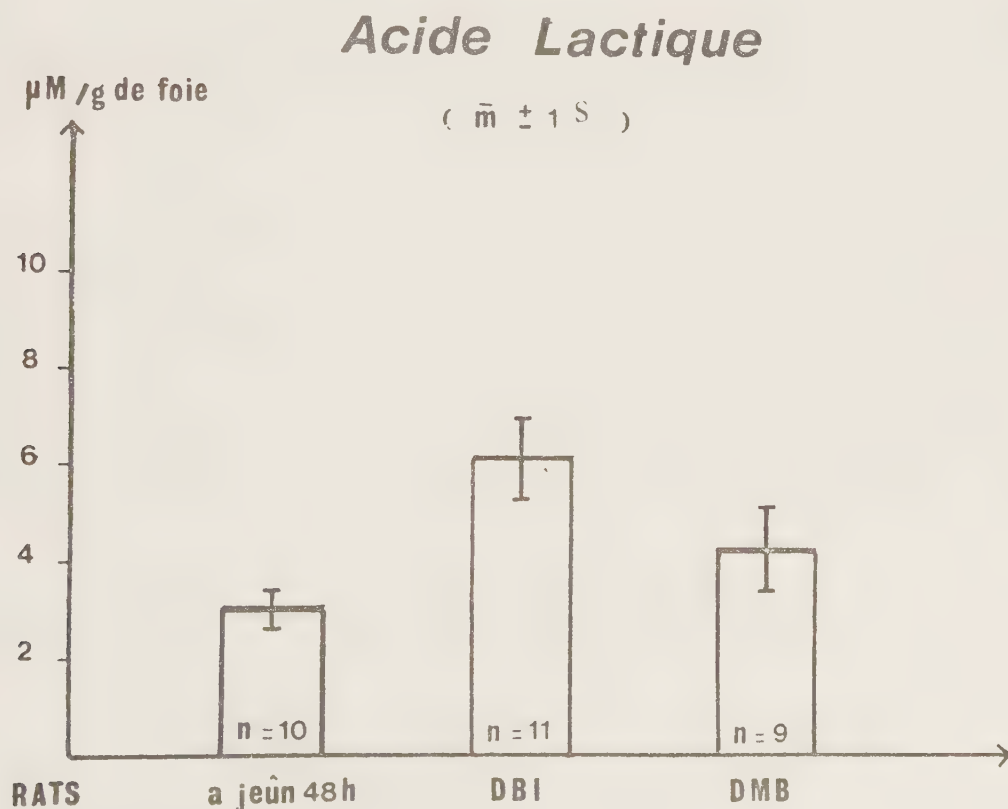


Figure 37 : Concentrations en acide lactique dans le foie de rats témoins à jeûn, pendant 48 heures et de rats traités par le DBI (250 mg/kg/48 heures) et de DMB (700 mg/kg/48 heures).

Dans le cas particulier de l'éthanol, SANDLER (397) et HAECKEL (184) ont montré chez le lapin, une inhibition de la gluconéogénèse et une anoxie des cellules hépatiques, par interférence dans le transfert d'électrons de la chaîne respiratoire. Il est intéressant de rapprocher les travaux de SANDLER et ceux de RUBIN (394) et de FRENCH (156). Ces auteurs signalent en effet des mitochondries de forme atypique chez le sujet alcoolique. Les biguanides dans tous ces cas, ne feraient qu'aggraver un déséquilibre déjà existant.

Une hyperlactacidémie est observée également au cours des traitements de longue durée ou après administration de doses élevées de DBI, consécutive à une irritation adrénargique potentialisée par le biguanide (29, 31, 40, 119, 452).

Enfin, selon BENGTSSON (29) l'hyperlactacidémie est associée à une atteinte rénale. Le traitement par le DBI est donc contre indiqué lorsque la clearance de la créatinine est légèrement augmentée.

L'augmentation de la concentration de l'acide lactique dans le sang et les tissus, a également été observée chez l'animal.

Elle serait due à une anoxie cellulaire qui a pour effet d'inhiber la lipogénèse et la gluconéogénèse.

Les travaux de PEREIRA (362) sur le tissu adipeux de rat, mettent en évidence un blocage de la décarboxylation du pyruvate et de l'oxydation de l'acétate dans le cycle tricarboxylique, probablement par interférence du DBI avec les transporteurs d'électrons.

Le ralentissement du shunt des pentoses et de la lipogénèse est parallèle à une accumulation d'acide lactique. HAECKEL (186) constate également une augmentation de cet acide dans le sang de la veine cave, après une injection de 12 mg/kg de DBI à des cobayes à jeûn 48 heures.

Cependant l'addition in vitro de $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ (185, 187) ou 3 à $8 \times 10^{-4} \text{ M}$ (6) de DBI au liquide de perfusion du foie de cobaye, provoque une inhibition d'environ 60 % de la gluconéogénèse à partir de l'acide lactique.

Cet effet apparaît également dans le foie de rats à jeûn pendant 48 heures, perfusés avec $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ de DBI. L'effet inhibiteur n'apparaît qu'après 20 à 40 minutes. Il s'applique aussi à d'autres substrats tels que le fructose et le glycérol. L'inhibition à partir du glycérol est d'ailleurs plus forte que celle observée à partir du lactate (308).

Pourtant TOEWS (462) constate une augmentation du PEP, pyruvate, 2 phosphoglycérate, 3 phosphoglycérate, dans le foie de rat perfusé par du lactate et du DBI. En revanche, le glycérol phosphate, le fructose 6 phosphate et le glucose 6 phosphate sont abaissés. Ces observations seraient donc en faveur d'une inhibition du cycle tricarboxylique.

IPAKTCHI (218) observe chez le cobaye une corrélation remarquable entre la baisse de la glycémie et l'augmentation du taux d'acide lactique et d'acide pyruvique sanguins, aussi bien après traitement par le DBI que par l'insuline. L'hypothèse d'une hyperlactacidémie par anoxie cellulaire doit donc être rejetée. IPAKTCHI suppose par contre, que l'hyperlactacidémie dépend des réactions hormonales que provoque dans l'organisme une hyperglycémie. Il se produirait une augmentation de la sécrétion d'adrénaline et une mobilisation de glycogène musculaire conduisant à l'acide lactique. Les concentrations en acide lactique et en acide pyruvique étant plus élevées après traitement par les biguanides que par l'insuline, indiquent une inhibition de l'utilisation de ces deux substrats, pour la gluconéogénèse. Ces résultats sont confirmés in vitro, sur des coupes de rein de cobaye (218) ou de rat (434).

Ce mécanisme d'action pourrait expliquer également l'augmentation du niveau de l'acide lactique au cours de nos essais sur le foie de rat. Cet effet est obtenu aussi bien après injection de DMB que de DBI. Le niveau du lactate hépatique est plus élevé toutefois, après traitement par le DBI, bien que ce produit n'ait aucun effet hypoglycémiant chez le rat. Nous devons souligner le fait que les doses administrées sont élevées et favorisent probablement l'acidose lactique.

Si l'on admet l'hypothèse d'une inhibition de la gluconéogénèse, compensée par une augmentation de la glycolyse anaérobie, les concentrations en lactate, sanguin et urinaire, devraient être augmentées chez le diabétique traité par les biguanides hypoglycémiantes. Ce n'est pas le cas lorsque le diabète est équilibré et sans affection secondaire. Le rapport entre le mécanisme d'action des biguanides et le niveau de l'acide lactique sanguin, n'est donc pas définitivement établi.

Cependant, la mesure isotopique du turn-over du glucose et du lactate chez des sujets traités par le DBI apporte de nouveaux éléments dans ce débat. Les travaux de SEARLE (429) et KREISBERG (252, 253) définissent en effet, l'équilibre de la glycolyse et de la gluconéogénèse chez le sujet sain, obèse et diabétique. Selon SEARLE, l'oxydation accrue du glucose dans les tissus est compensée par une accélération du turn-over du glucose par l'intermédiaire du cycle de CORI (50 %) et probablement de la gluconéogénèse. En effet, la vitesse de transformation du glucose en lactate est accélérée, suivie d'une incorporation du lactate dans la molécule de glucose.

L'oxydation périphérique du glucose a pu être mesurée en analysant l'air expiré par les sujets traités. SEARLE observe une légère augmentation de CO_2 après la prise de DBI chez les sujets diabétiques (429) et non diabétiques (428). Les résultats obtenus par KREISBERG sont plus inconstants. L'oxydation du glucose est plus faible chez les sujets sains (252). Elle est variable chez les sujets obèses.

Les conditions opératoires utilisées par les auteurs sont différentes. SEARLE (429) administre des doses de 100 mg par jour de DBI à des sujets sains. Les résultats publiés par KREISBERG (252, 253) sont obtenus sur des sujets obèses non diabétiques, après six à sept jours de traitement à raison de 100 à 150 mg/jour de DBI.

Chez les non diabétiques, il est possible que l'accélération de la glycolyse aérobie mais surtout anaérobie entraîne une compensation par la voie de la gluconéogenèse. SEARLE explique ainsi l'absence d'effet hypoglycémiant chez des sujets normaux traités par les biguanides. Les résultats obtenus dans une première série d'observations sur des sujets diabétiques, montrent également une accélération du turn-over du glucose. Dans ce cas, l'effet hypoglycémiant correspondrait à l'activité glycolytique du DBI puisque la gluconéogenèse est maximum.

D'après KREISBERG au contraire, la totalité du recyclage se fait par le cycle de CORI. L'interconversion du glucose en lactate est accélérée vers la production de lactate qui se transforme à nouveau en glucose. Sous l'effet des biguanides, il s'établit un nouvel équilibre glucose-lactate sans que le taux de CO_2 soit modifié. Celui-ci pourrait être déplacé au cours des diabètes associés à une affection secondaire. Il est probable en effet, que l'incorporation du lactate dans la molécule de glucose n'ait pas lieu et conduise à une hyperlactacidémie.

Ce nouvel aspect du mécanisme d'action des biguanides est en contradiction avec l'inhibition de la gluconéogenèse à partir de précurseurs tels que les acides aminés et l'acide lactique (218).

La polémique sur l'effet hyperlactacidémiant du DBI, n'est donc pas encore éteinte.

Le rôle des métaux au cours de la gluconéogénèse est important, bien qu'il soit encore mal connu. Nous avons donc dosé le magnésium et le calcium.

13.6. CATIONS

13.6.1. Résultats

Dans le cas du calcium, la moyenne est de $3,3 \pm 1,3 \mu\text{g/g}$ de foie de rats traités par le DBI, donc nettement inférieure aux témoins à jeûn pendant 48 heures (figure 38). Celle-ci est de $4,5 \mu\text{g/g}$ de foie.

Le magnésium est légèrement plus faible. La moyenne obtenue est de $103 \mu\text{g/g}$ de foie alors qu'elle est de $107 \mu\text{g/g}$ de foie chez les rats témoins (figure 39). Cette différence n'est pas statistiquement significative.

La concentration du calcium est légèrement augmentée après un traitement par le DMB. Elle est de $4,6 \pm 1,4 \mu\text{g/g}$ de foie (figure 38). Le magnésium ne varie pas (figure 39).

Après traitement par le DBI, nous avons obtenu pour le calcium trois résultats plus élevés : $19,4 - 37,6 - 46 \mu\text{g/g}$ de foie. Nous n'avons pas constaté une telle augmentation chez les autres animaux traités ou témoins. Le niveau élevé du calcium est accompagné d'autres perturbations :

- concentrations en magnésium élevées
- taux de protéines abaissés

Les activités enzymatiques de la GOT et de la MDH, la concentration en acide lactique et la glycémie sont proches des valeurs obtenues avec les autres animaux.

Nous n'avons pas tenu compte de ces trois cas isolés dans le calcul des moyennes.

13.6.2. Discussion

L'importance du rôle des cations dans les voies métaboliques est liée étroitement au développement des techniques de dosage. L'amélioration de la sensibilité des méthodes, a permis de préciser la localisation des métaux dans la cellule ainsi que leur liaison spécifique à certaines protéines.

La majeure partie du calcium et du magnésium dans la cellule est liée au noyau et aux mitochondries. Une faible quantité de calcium, se trouve également dans la fraction cytoplasmique sous forme ionisée (126).

La quantité de calcium intracellulaire liée à la mitochondrie est deux fois plus élevée que celle du magnésium. Le rapport est inversé dans le cytoplasme.

Les mitochondries semblent donc être le lieu de stockage du calcium intracellulaire (126, 466). L'accumulation du calcium intramitochondrial nécessite la présence d'un excès de magnésium. L'amplitude du phénomène varie cependant d'un tissu à l'autre. Par exemple, les mitochondries de rein ou de muscle stockent davantage de calcium que celles de foie. Ces observations conduisent à penser que les mitochondries pourraient régler la concentration en calcium du cytoplasme des cellules, contrôlant ainsi d'autres phénomènes physiologiques, et en particulier la gluconéogenèse et le cycle tricarboxylique (466). En effet, le calcium inhibe la phosphofructokinase et la pyruvate kinase (126) et il est nécessaire pour l'oxydation mitochondriale du NADH (85).

Enfin, le degré d'inhibition de l'ATPase, est fonction de la concentration en ions Ca^{2+} et Mg^{2+} . A pH 6,4, l'enzyme est activée par addition de Ca^{2+} . Au contraire, à pH 9, l'ATPase est inhibée par Ca^{2+} et activée par le Mg^{2+} (490). Il est donc possible que la baisse du contenu en ATP hépatique (361, 397) soit due à un effet indirect des biguanides sur l'ATPase, par l'intermédiaire des ions Ca^{2+} ou Mg^{2+} . Mais pour FALCONE (135), SCHAFER (404) et SOLING (442) cette hypothèse ne semble pas réelle. Nous n'avons pas observé de variations du Mg^{2+} dans le foie de rats traités par le DBI ou le DMB. En revanche, les variations du Ca^{2+} sembleraient indiquer que les biguanides pourraient exercer un effet par l'intermédiaire de ce cation.

D'autres cations que le Ca^{2+} et le Mg^{2+} sont impliqués dans la régulation de la gluconéogenèse. MUKERJI (330) et SNOKE (440) en particulier, ont mis en évidence une activation de la PEP carboxylase selon un ordre décroissant, par le Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} et Fe^{3+} . Le Mn^{2+} se fixe sur l'enzyme pour former un complexe lié à la protéine. Il se fixe d'une manière semblable à la PEP carboxykinase et à la pyruvate kinase (317, 318).

Le rôle de ce cation semble impliqué dans le mécanisme d'action des biguanides.

D'après les travaux de LESCURE et VOLFIN (269) la gluconéogenèse, à partir du lactate et du malate, est inhibée en présence de Mn^{2+}

Cet effet a été montré :

- . sur des coupes de cortex rénal de rat
- . sur des homogénats de ce tissu
- sur la fraction cytoplasmique

Calcium

($\bar{m} \pm 1 S$)

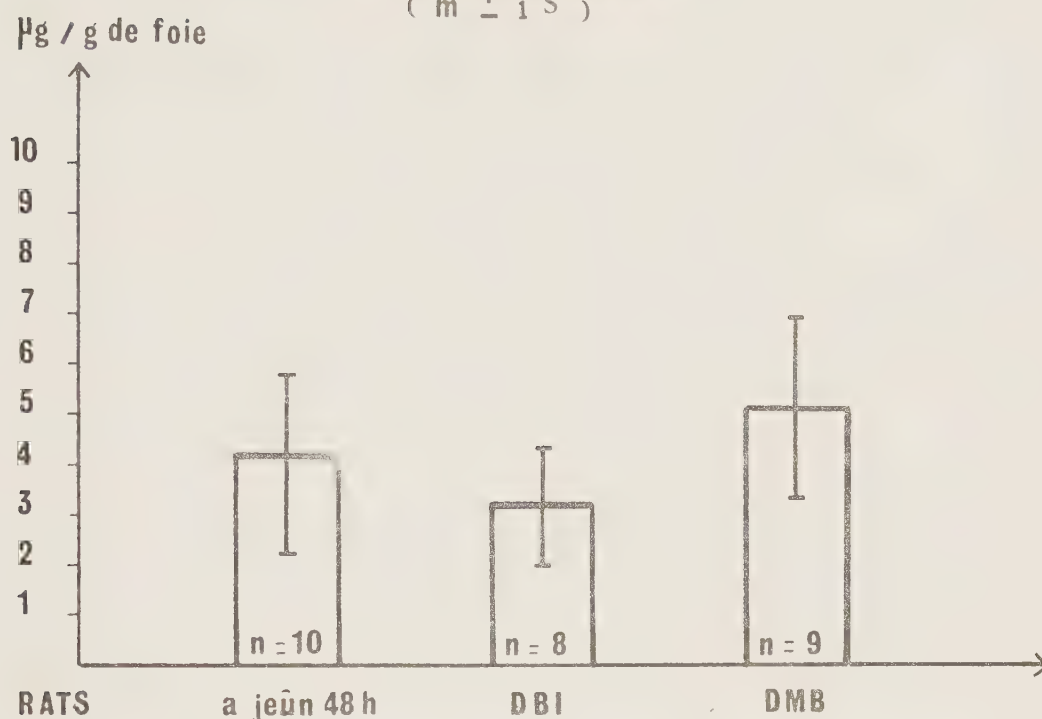


Figure 38 : Concentration en calcium dans le foie de rats témoins à jeûn pendant 48 heures et de rats traités par le DBI (250 mg/kg/48 heures) et le DMB (700 mg/kg/48 heures).

Magnesium

($\bar{m} \pm 1 S$)

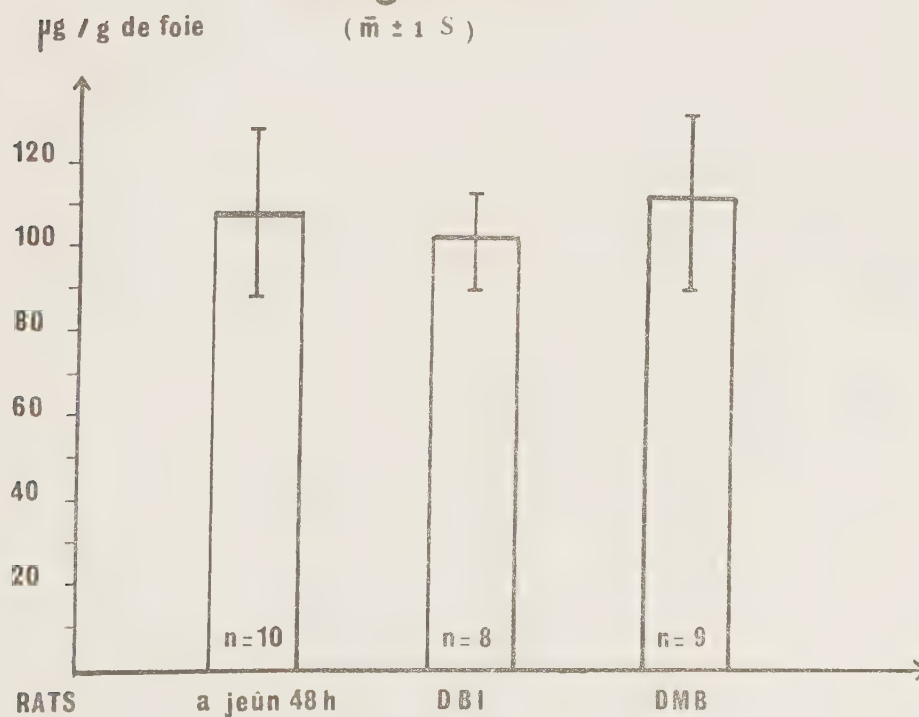


Figure 39 : Concentration en magnésium dans le foie de rats témoins à jeûn pendant 48 heures et de rats traités par le DBI (250 mg/kg/48 heures) et le DMB (700 mg/kg/48 heures).

La gluconéogénèse à partir du glycérol n'est pas modifiée.

L'effet inhibiteur du DBI est conditionné par une stimulation préalable de la PEP carboxykinase par le Mn^{2+} . Il serait dû, tout au moins en partie

- . soit à une inhibition compétitive des enzymes de la gluconéogénèse par le couple Mn^{2+} -biguanide. Elle concerne en particulier, la PEP carboxykinase, la glucose 6 phosphatase et probablement, la pyruvate carboxylase.
- . soit à la formation d'un complexe Mn^{2+} -biguanide.

Mais il est possible également que les biguanides exercent leur effet sur les nucléotides adényliques, par l'intermédiaire du Mn^{2+} .

Enfin, connaissant la compartimentation des enzymes de la gluconéogénèse dans la cellule, nous pouvons supposer que l'effet inhibiteur des biguanides s'exerce sur la membrane mitochondriale en modifiant sa perméabilité (72, 100, 167). LESCURE et VOLFIN (269) ne pensent pas que cette hypothèse soit réelle puisque l'inhibition de la gluconéogénèse en présence de Mn^{2+} et de DBI ou de DMB, s'exerce également sur la fraction cytoplasmique. Pourtant, dès 1966, IPAKTCHI (218) avait pensé à ce mécanisme bien qu'il n'ait pas établi la preuve expérimentale de son existence.

Nous avons tenté d'apporter quelques éléments à cette discussion au cours de notre étude in vitro, sur les mitochondries de foie de rat. Auparavant, nous avons vérifié si l'aspect morphologique de mitochondries de foie de rats, était modifié par un traitement par les biguanides hypoglycémiantes.

13.7. ETUDE MORPHOLOGIQUE DES MITOCHONDRIES

13.7.1. Résultats

Nous avons vérifié l'action des deux biguanides sur l'aspect morphologique des mitochondries de foie de rats traités par le DBI (figure 41) et par le DMB (figure 42).

Nous l'avons comparé à celui des mitochondries de rats témoins, à jeûn pendant 48 heures (figure 40).

Nous n'avons pas observé de différence lorsque les rats étaient traités par le DMB ou le DBI par rapport aux mitochondries de rats à jeûn pendant 20 heures. En revanche, nous avons remarqué une déformation en "croissant" de certaines mitochondries après un jeûne de 48 heures.

13.7.2. Discussion

Des variations de la morphologie des mitochondries de foie ont été déjà signalées au cours du jeûne, du diabète, de régimes hypergras, de déficits en acides gras libres et l'ingestion chronique d'alcool, dues probablement à une hydrolyse des phospholipides membranaires (156, 192). Ce phénomène serait partiellement réversible en présence d'ions phosphate (157).

Nous n'avons pas observé de différence sensible entre l'aspect des mitochondries de foie de rat à jeûn 20 heures et 48 heures. Nous avons remarqué toutefois, une fragilisation de leur structure après un jeûne de 48 heures, mise en évidence par la déformation et parfois la rupture des membranes (figure 40).

Chez le rat rendu diabétique par injection d'alloxane, la taille des mitochondries hépatiques est plus grande par rapport à celle d'un rat normal. Un traitement insulinique normalise cet aspect histologique.

L'image des mitochondries de foie des rats témoins à jeûn pendant 48 heures, est voisine de celle observée par HARANO (192) avec des mitochondries de foie de rat diabétique cétosique. Par contre, l'injection de DMB ou de DBI ne semble pas normaliser l'ultra-structure de ces organites sub-cellulaires.

Ces résultats devront être confirmés par la mesure polarographique de la phosphorylation oxydative de ces mitochondries, en présence des deux biguanides.

En effet, leur étude morphologique au microscope électronique est soumise à de nombreux artefacts techniques.

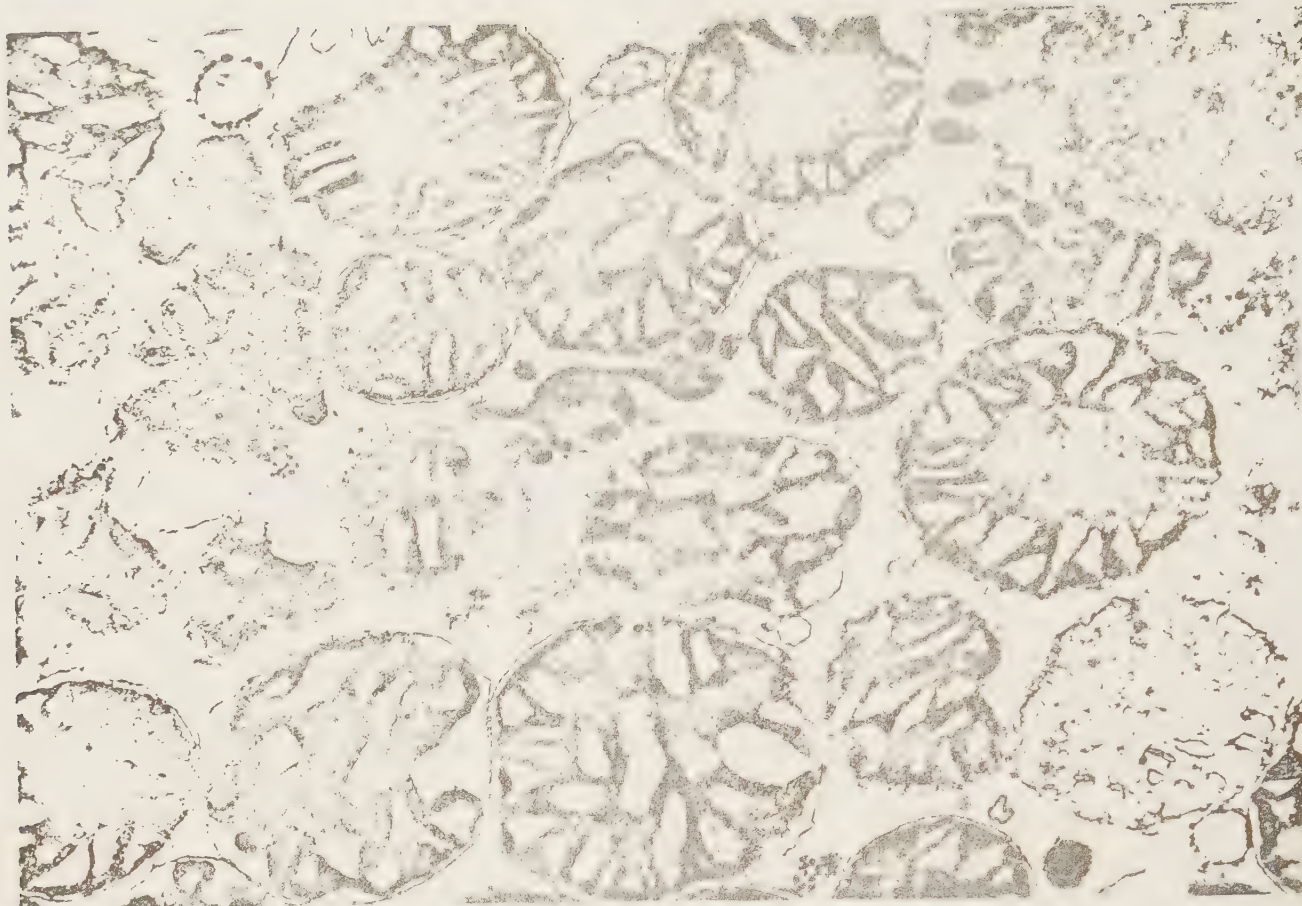


Figure 40 : Mitochondries de foie de rat à jeûn pendant 48 heures, observees au microscope électronique (grossissement 46500).

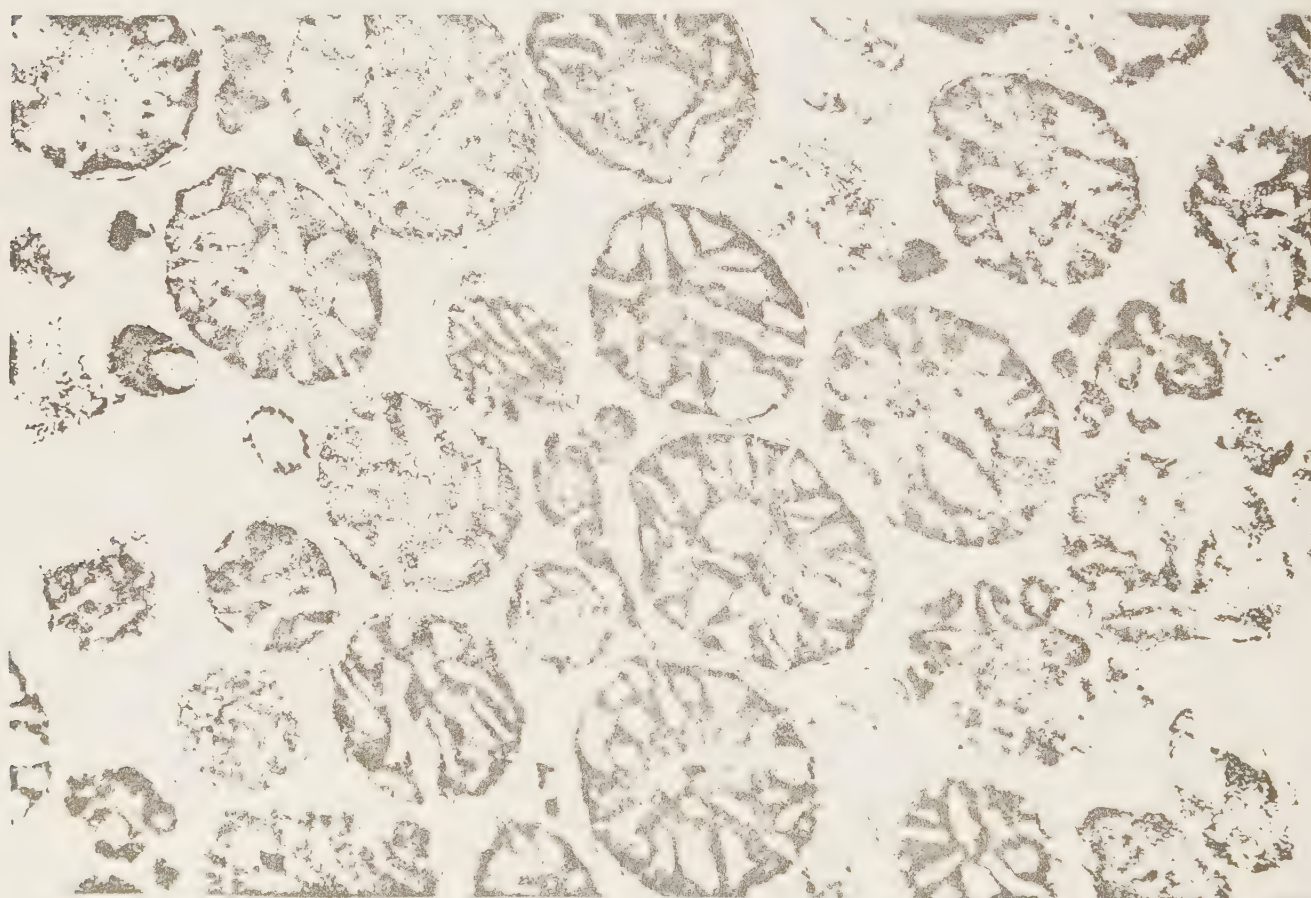


Figure 41 : Mitochondries de foie de rat traité par 250 mg/kg/48 heures de DBI. (Grossissement 46500).

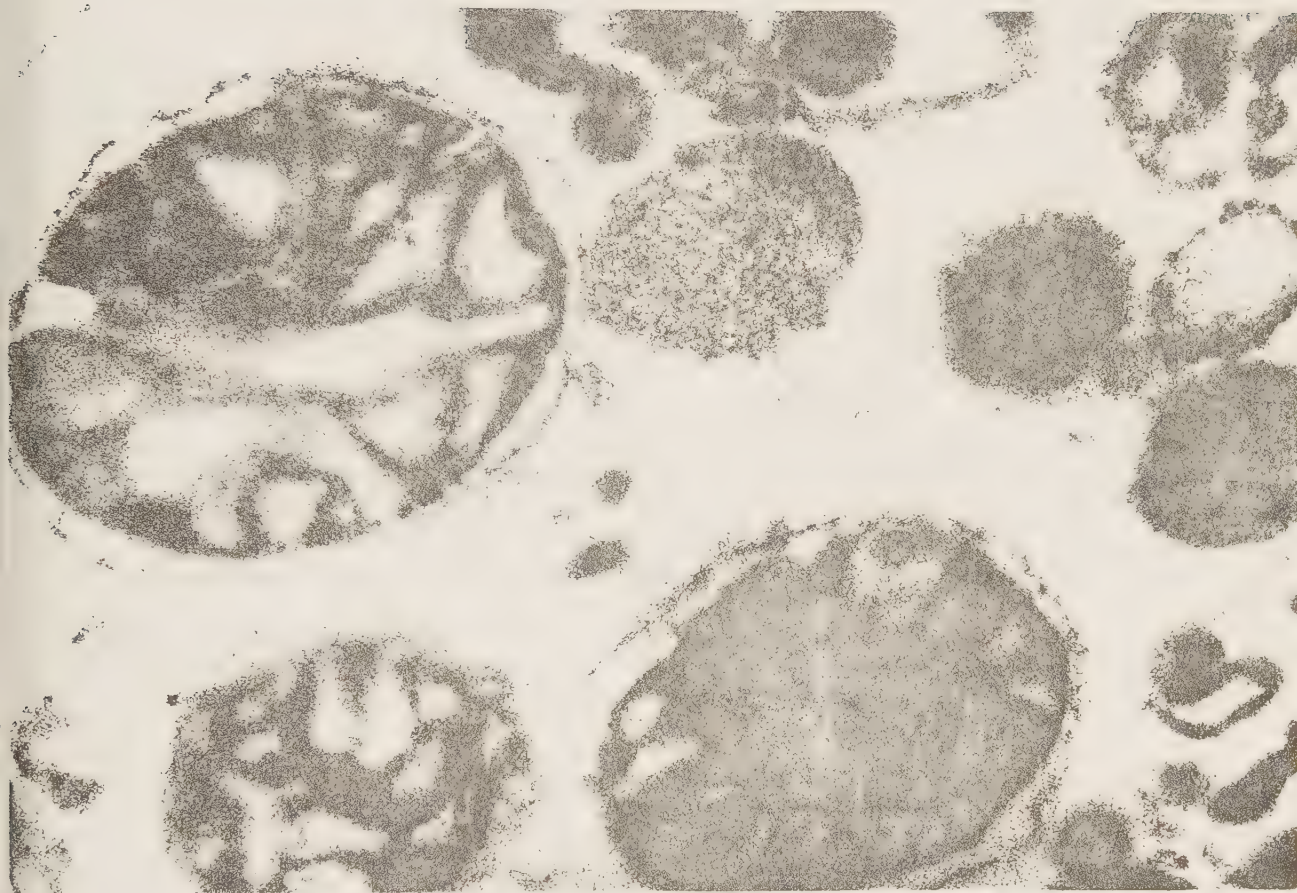


Figure 42 : Mitochondries de foie de rat traité par 700 mg/kg/48 heures de DMB.
(Grossissement 134 000).

13.8. CONCLUSION

Au cours de notre étude sur l'effet des biguanides *in vivo*, nous avons retrouvé une action hypoglycémiante importante chez le rat à jeûn pendant 48 heures et traité par le DMB. Elle ne varie pas après injection de DBI.

Nous avons mis en évidence parallèlement, une augmentation de la concentration en protéines et de l'activité enzymatique de la GOT dans le foie, quel que soit le biguanide administré.

La répartition des isoenzymes de la GOT dans la cellule est légèrement modifiée. L'activité de la MDH est plus élevée, après traitement par le DMB, alors qu'elle est plus faible après injection de DBI.

D'autre part, nous avons remarqué une concentration hépatique importante des substrats de la gluconéogénèse : acides aminés et acide lactique. Le magnésium ne varie pas après injection de deux biguanides. Par contre, le calcium est abaissé lorsque le rat est traité par le DBI. La valeur par rapport aux témoins, n'est pas modifiée par injection de DMB.

Il est donc probable que les biguanides, en inhibant la gluconéogénèse, provoquent une accumulation de substrats disponibles plus importante, mise en évidence par l'activité plus élevée de la GOT.

Cependant, les mécanismes d'action des deux biguanides chez le rat sont différents, puisque la glycémie, la concentration en protéines dans le foie, la répartition des isoenzymes de la GOT, l'activité de la MDH et la concentration en calcium hépatiques ne sont pas identiques, chez le rat traité par le DMB et chez le rat traité par le DBI.

Dans l'organisme entier, les relations interorganes sont nombreuses et complexes. Il est possible que les variations observées soient dues à des régulations nerveuses ou hormonales.

Pour tenter d'expliquer les variations de la GOT observées in vivo, nous avons continué notre travail par des essais réalisés in vitro, sur les fractions sub-cellulaires purifiées de foie de rat, et en particulier sur les mitochondries.

CHAPITRE XIV

ETUDE DE L'EFFET DES BIGUANIDES IN VITRO

Les résultats que nous avons obtenus in vivo chez le rat sont difficiles à expliquer du point de vue du mécanisme d'action des biguanides. Les variations de l'acide lactique, du calcium et des acides aminés sembleraient indiquer une inhibition de la gluconéogénèse. Mais cette inhibition ne toucherait pas la GOT qui est augmentée.

Nous pouvons remarquer que chacun de ces substrats, sauf l'acide lactique, a une double localisation intracellulaire : mitochondriale et cytoplasmique. La première étape de la gluconéogénèse conduisant à la synthèse du PEP, se déroule également dans ces deux compartiments cellulaires (conf. chapitre XII).

Ces arguments nous ont donc orientés vers une étude in vitro de la modification de la perméabilité de la membrane des mitochondries en présence de DMB et de DBI. Dans ce but, nous avons suivi les variations de l'activité de la GOT et de l'un de ses substrats, l'acide aspartique, dans le milieu intra et extramitochondrial.

Mais auparavant il était nécessaire de vérifier l'influence des deux biguanides sur l'activité des isoenzymes de la GOT.

14.1. ETUDE DE L'INFLUENCE DES BIGUANIDES SUR L'ACTIVITE DES ISOENZYMES DE LA GOT

La GOT mitochondriale est isolée à partir du culot de mitochondries obtenu après ultracentrifugation d'un homogénat de foie de rat. L'isoenzyme cytoplasmique est obtenue à partir du deuxième surnageant. Chaque isoenzyme est purifiée par chromatographie sur colonne de DE 52.

Nous avons effectué une dialyse une nuit à +4°C contre du tampon phosphate 8 mM de la fraction cytoplasmique purifiée.

Les activités enzymatiques sont mesurées à 37°C (voir page 1). Les résultats correspondent à la moyenne de trois mesures. Nous avons accompagné chaque dosage d'un témoin dans lequel 20 µl de solution de biguanide (soit 2 µmol) sont remplacés par 20 µl d'eau distillée.

Les deux biguanides ne modifient pas l'activité des isoenzymes de la GOT (tableaux 39 et 40).

Malgré les concentrations élevées utilisées, les systèmes enzymatiques isolés ne sont sensibles ni au DMB ni au DBI. Ces résultats, déjà obtenus par IPAKTCHI pour l'activité globale de la GOT (218) nous assurent que toute modification de l'activité de la GOT, observée sur des mitochondries entières, ne pourra être imputée à un effet direct des biguanides sur l'enzyme quelle que soit la forme moléculaire, mais à un effet sur la membrane mitochondriale.

TABEAU XXXIX : INFLUENCE DU DBI SUR L'ACTIVITE DES ISOENZYMES DE LA GOT

	Témoin (mU/ml)	DBI (mU/ml)	Pourcentage par rapport au témoin
Temps d'incubation (mn)	5	5	5
Premier surnageant	9496	9985	105
Isoenzyme mitochondriale	313	320	102
Isoenzyme cytoplasmique	349	351	100,5

TABEAU XXXX : INFLUENCE DU DMB SUR L'ACTIVITE DES ISOENZYMES DE LA GOT

	Témoin (mU/ml)	DBI (mU/ml)	Pourcentage par rapport au témoin
Temps d'incubation (mn)	5	5	5
Premier surnageant	9208	9386	102
Isoenzyme mitochondriale	398	417	105
Isoenzyme cytoplasmique	251	254	100,5

14.2. ETUDE DE L'INFLUENCE DES BIGUANIDES SUR LA PERMEABILITE DES MITOCHONDRIES

Notre étude sur le passage des enzymes ou des substrats à travers la membrane mitochondriale, en présence de biguanides, est soumise à trois impératifs :

- Les mitochondries doivent être isolées à partir d'un tissu dans lequel la gluconéogénèse est prépondérante. Nous avons donc effectué nos essais sur des mitochondries de foie de rat à jeûn pendant 20 heures. Les résultats obtenus ont été contrôlés par des essais complémentaires sur des mitochondries de foie de rat alimenté.
- La structure de la membrane mitochondriale ne doit pas être altérée pendant l'ultracentrifugation. En effet, GREEN (176) a montré que la mitochondrie devait être intacte pour assurer l'oxydation des substrats. La L.histidine apparaît pour CONNELLY et MYRON (86) ainsi que pour ESTRADA (128) comme un facteur essentiel dans le maintien de l'intégrité de la membrane mitochondriale. Cet acide aminé interviendrait, entre autres, au niveau de la chaîne respiratoire par un effet "stabilisant" de l'énergie produite au cours de la phosphorylation oxydative.

Cependant, à cause de cette interférence possible, nous avons évité l'emploi de ces produits au cours de nos essais pour étudier in vitro, l'influence des biguanides hypoglycémisants sur l'activité de la GOT mitochondriale.

- La phosphorylation oxydative doit être couplée au transport des électrons.

Au cours des essais préliminaires, les mitochondries ont été isolées dans la saccharose 0,25 M Tris 1 mM. Le contrôle physiologique de la respiration des mitochondries a montré un découplage de la phosphorylation oxydative dans ce milieu.

La pureté des réactifs, et particulièrement celle du saccharose, est certainement en cause. Nous n'avons pas observé de découplage en isolant les mitochondries dans une solution de mannitol 0,3 M, EDTA 0,1 M pH 7,4. En effet, la pureté de ce glucide de synthèse (concentration inférieure en métaux lourds) est supérieure à celle du saccharose.

Notre choix s'est donc fixé sur cette dernière solution pour isoler les mitochondries.

14.2.1. Effet des biguanides sur la sortie de la GOT mesurée directement sur des mitochondries

Les conditions opératoires du dosage de l'activité de la GOT dans les mitochondries sont identiques à celles décrites ci-dessus. Dans le dosage témoin, 20 μ l de la solution de biguanide sont remplacés par 20 μ l de solution d'extraction.

En présence de DBI, nous avons constaté une activité plus grande de la GOT dans le milieu réactionnel (tableau 41). Nous avons effectué nos premiers essais sur mitochondries de rat à jeûn pendant 20 heures. A la suite des résultats obtenus, nous avons poursuivi nos essais par une étude sur des mitochondries de rat alimenté d'une part et de rat à jeûn pendant 48 heures d'autre part. Nous avons constaté une augmentation de l'activité transaminasique quel que soit l'état nutritionnel de l'animal. Nous avons remarqué une progression linéaire de l'activité en fonction du temps d'incubation (figure 43). Cette augmentation est plus rapide durant les vingt premières minutes d'incubation avec les mitochondries de rat à jeûn pendant 48 heures. Nous n'avons pas retrouvé cette augmentation de l'activité de la GOT en présence de DMB (tableau 42). En revanche, nous avons observé une activité légèrement plus faible par rapport à celle du témoin, durant les vingt premières minutes d'incubation.

Cette constatation avec le DBI peut s'expliquer de deux manières :

- 1) une fragilisation des mitochondries en présence de DBI ayant pour conséquence une libération de GOT dans le milieu extérieur où elle est plus facilement dosable.
- 2) par une activation du passage de l'acide aspartique dans le compartiment mitochondrial, accompagnée d'un fonctionnement enzymatique non inhibé par les phénomènes de membrane, ce que nous avons tenté de vérifier.

14.2.2. Consommation d'acide aspartique par des mitochondries sous l'influence des biguanides

Nous avons utilisé une solution d'acide aspartique 0,2 M dans une solution tampon phosphate 0,1 M.

La composition du milieu d'incubation est la suivante :

. Acide aspartique 0,2 M	7,5 ml
. Mitochondries (soit 120 à 150 mg de protéines mitochondriales)...	1,5 ml
. Biguanide 0,1 M dans l'eau distillée.....	0,3 ml

Le temps d'incubation à 37°C est fixé à 15 minutes.

TAB^{LEAU} XXXXI : Effet du DBI sur l'activité de la GOT mesurée sur un culot de mitochondries

Temps d'incubation (minutes)	Rat alimenté		Rat à jeûn pendant 20 heures		Rat à jeûn pendant 48 heures	
	Activité Enzymatique (mU/ml)	Pourcentage par rapport au témoin	Activité Enzymatique (mU/ml)	Pourcentage par rapport au témoin	Activité Enzymatique (mU/ml)	Pourcentage par rapport au témoin
3					17 325	123
5	17 493	114,5	29 000	123	19 250	142,5
8 10	22 775	164	31 150	125,5	19 406 20 240	121,5 116,5
12 15	22 905	173	34 800	133,5	19 680 22 630	140,5 132,5
20	24870	167,5	35 530	143,5	22 960	147,5
30	27 880	171	39 360	155	24 325	147,5
45	26 785	188,5	45 920	177,5	27 330	157
60	31 706	187,0	49 200	195,5	30 000	186,5

TABLEAU XXXXII: Effet du DMB sur l'activité de la GOT mesurée sur un culot de mitochondries

Temps d'incubation (minutes)	Rat alimenté		Rat à jeûn pendant 20 heures		Rat à jeûn pendant 48 heures	
	Activité Enzymatique (mU/ml)	Pourcentage par rapport au témoin	Activité Enzymatique (mU/ml)	Pourcentage par rapport au témoin	Activité Enzymatique (mU/ml)	Pourcentage par rapport au témoin
5	12 790	99	19 297	69,5	13 409	87,5
10	20 500	94,5	25 875	80,5	13 649	88,0
15	13 535	91,0	29 848	85,5	14 979	83,0
20	13 930	98,5	22 413	91,0	15 748	97,0
30	13 800	94,0	20 992	85,5	20 500	105,5
45	13 920	99,5	24 190	87,5	14 602	102,0
60	12 790	104,5	23 051	93	15 433	104,5

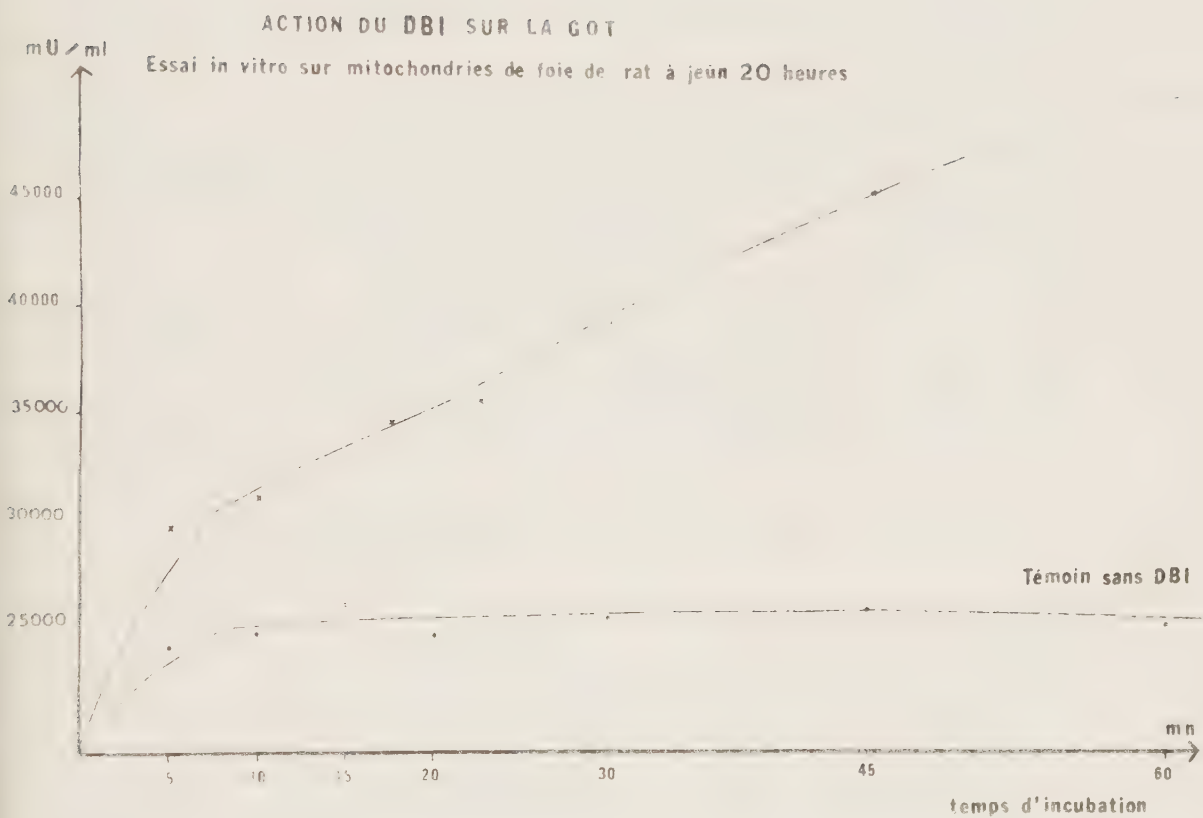


Figure 43 : Action du DBI sur l'activité de la GOT mesurée sur un culot de mitochondries. Les résultats sont exprimés en mU/ml de mitochondries de foie de rat à jeûn pendant 20 heures.

Après centrifugation, l'acide aspartique est dosé par chromatographie sur colonne de résines échangeuses d'ions dans le surnageant et dans les mitochondries broyées dans deux aliquotes de 5 ml de mannitol 0,3 M EDTA 0,1 M, Triton X 100 à 1°.

Seule une première série d'expérimentations (3 essais) a été réalisée.

Après incubation des mitochondries 15 minutes à 37°C, en présence d'acide aspartique et de DMB, la concentration de cet amino-acide dans le surnageant est inférieure aux valeurs obtenues pour le témoin. Les résultats obtenus, exprimés en pourcentage par rapport au témoin, sont en moyenne inférieurs de -25 %.

Avec le DBI, la baisse de la concentration en acide aspartique dans le surnageant est du même ordre. Elle est en moyenne de -32 %.

Nous avons dosé en parallèle la concentration en acide aspartique dans les mitochondries. Elle est plus basse en présence de DMB. Les résultats obtenus sont de -10 %. Ils sont de +6 % avec le DBI.

Ces premiers résultats méritent d'être confirmés.

14.2.3. Discussion

Nous avons obtenu des variations de l'activité de la GOT au cours de nos essais in vitro sur des mitochondries de foie de rat. En effet, la mesure de l'activité globale de la GOT dans un milieu contenant des mitochondries entières a mis en évidence une augmentation de cette activité en présence de DBI. Elle ne varie pas en présence de DMB.

Il est probable que les mitochondries, fragilisées par le DBI, libèrent la GOT mitochondriale qui est alors dosée dans le milieu extramitochondrial.

Cette première approche de l'effet des biguanides confirme notre hypothèse d'une possibilité d'intervention au niveau des membranes mitochondriales.

Les études récentes de SCHAFER (405) et DAVIDOFF (100) sur la cinétique du passage des biguanides à travers la membrane mitochondriale apportent des arguments pour expliquer ces phénomènes. Leur transfert a été observé à partir de mitochondries de coeur de cobaye (100), de foie de rat (405) ou de membranes synthétiques (405).

Le passage des biguanides dans la mitochondrie est fonction du pH et de la composition ionique du milieu extramitochondrial.

- La quantité de biguanide qui peut s'accumuler dans la mitochondrie augmente lorsque le pH du milieu extérieur est déplacé vers les pH alcalins. Elle est proportionnelle à la longueur de la chaîne carbonée du biguanide.
- En présence de cations mono et bivalents, tels que K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , et des acides gras à chaîne longue, la captation des biguanides est ralentie. L'effet du K^+ est plus marqué que celui du Na^+ . L'action du Mg^{2+} est biphasique. Elle varie avec la concentration de ce métal dans le milieu extérieur. Aux faibles concentrations, les biguanides s'accumulent dans la mitochondrie en inhibant leur respiration. Pour des valeurs supérieures, cette action est inversée.

L'effet des cations s'explique par une augmentation de la valeur du pH intramitochondrial.

Les mécanismes d'action proposés par les deux auteurs sont cependant différents.

Selon DAVIDOFF (100) les cations monovalents (surtout K^+) occuperaient le même site de liaison que l'ion biguanide. Le transfert de DBI se ferait donc par compétition avec l'ion K^+ . Lorsque la valeur du pH augmente, un nombre plus important de sites anioniques de la membrane mitochondriale devient alors accessible et favorise le passage du biguanide. Il semblerait que le transfert s'effectue par un mécanisme de diffusion non ionique, limité par le gradient de pH entre le milieu intra et extramitochondrial.

SCHAFER (405) estime cependant que le gradient de pH est insuffisant pour expliquer non seulement le transfert mais l'accumulation des biguanides dans la mitochondrie selon la longueur de leur chaîne carbonée. Les arguments développés par SCHAFER complètent les observations faites par DAVIDOFF (100).

SCHAFER (405) a réussi à mettre en évidence une fixation très rapide de ces différents composés sur la membrane mitochondriale. Cette première phase dure environ 60 secondes. Elle s'accompagne d'une libération de protons.

Les propriétés lipophiles des biguanides suggèrent que le site de liaison est de nature phospholipidique. La quantité de biguanide liée à la membrane, est plus élevée lorsque la mitochondrie est à l'état actif.

Les biguanides pénètrent ensuite dans la mitochondrie sous forme non protonisée. Ce transfert est réalisé de façon active grâce au potentiel électrique de la membrane assuré par le pool de protons intra-mitochondriaux. Cette dernière phase dure environ quinze minutes.

Ces résultats obtenus in vitro sur des mitochondries ou des membranes synthétiques, sont confirmés par les travaux de HAECKEL (186) sur le foie de cobaye perfusé. Si la formation du glucose n'est pas modifiée par une variation du pH, ce facteur en revanche intervient nettement lorsque du butylbiguanide (186) ou du DBI (185, 187) est ajouté au milieu de perfusion. L'inhibition de la gluconéogénèse est sensible au pH et s'accompagne d'une captation accrue des ions K^+ lorsque le pH augmente. En présence de biguanide, la captation du K^+ par le foie est ralentie. Cet effet est plus marqué vers les pH alcalins.

L'action des biguanides sur la perméabilité de la membrane mitochondriale se trouve donc bien établie, bien que son mécanisme précis ne soit pas encore totalement élucidé. Cet effet explique en partie, la répartition différente de l'acide aspartique entre le milieu intra et extramitochondrial lorsque les mitochondries sont incubées en présence de biguanides. Il semblerait que le transfert de l'acide aminé dans la mitochondrie ne soit pas influencé par l'addition de biguanides, puisque sa concentration intramitochondriale, en général, est peu modifiée.

14.3. ETUDE DE L'EFFET DES BIGUANIDES SUR LA RESPIRATION DES MITOCHONDRIES

Le biguanide est à une concentration de 0,1 M dans le milieu polarographique. 20 μ l sont ajoutés dans le milieu d'incubation à l'aide d'une seringue AGLA.

La mesure de l'activité de la GOT et de la MDH intra et extramitochondriales, est effectuée dans des conditions voisines. Le volume de la cellule utilisée est dans ce cas de 9,5 ml.

Le milieu d'incubation est constitué par :

. Milieu polarographique (voir page 56).....	8,0 ml
. Mitochondries (soit 80 à 100 mg de protéines mitochondriales.	1,2 ml
. Biguanide 0,1 M dans le milieu polarographique.	0,1 ml
. Acide glutamique 0,5 M	0,1 ml
. ADP 12,5 M	0,1 ml

14.3.1. Résultats

La respiration des mitochondries en présence de biguanides est mesurée parallèlement à des témoins sans addition de biguanides au milieu d'incubation. Trois séries d'essais ont été effectuées.

14.3.1.1. Mesures sans addition de substrat exogène

En présence de 2 μ mol de DMB ou de DBI, nous avons constaté une légère accélération de la consommation d'oxygène pendant l'oxydation des substrats endogènes (tableau 43).

TABEAU XXXXIII : MESURE DE LA CONSOMMATION D'OXYGENE PAR
LES MITOCHONDRIES DE FOIE DE RAT, PENDANT
L'OXYDATION DES SUBSTRATS ENDOGENES

	Consommation d'oxygène (n At/mn)	
	Témoin	Mesure
DMB (2 μ mol)	31,9	35,5
	38,0	39,5
	34,8	38,6
	42,4	46,2
	34,5	41,7
	45,2	48,5
	50,0	56,6
DBI (2 μ mol)	71,0	87,3
	71,0	85,5
DBI (1 μ mol)	71,0	89,2
	42,2	45,1
	50,9	66,2

14.3.1.2. Mesures avec addition de biguanide avant celle du substrat

Le DMB, ajouté avant l'addition du substrat, n'a aucun effet sur l'oxydation couplée à la phosphorylation puisque le rapport $\frac{\text{ADP}}{\text{O}}$ n'est pas modifié (Tableau 44).

Par contre, nous avons observé un découplage de la phosphorylation oxydative en présence de 2 μ mol de DBI. Cet effet apparaît encore avec 1 μ mol de DBI (Tableau 45).

BLEAU XXXXIV : MESURE DE LA RESPIRATION DES MITOCHONDRIES DE FOIE DE RAT EN PRESENCE DE 2 μ mol. DE DMB AJOUTE AVANT L'ADDITION DU SUBSTRAT ($\bar{m} \pm 1s$)

	Protéines (mg dans la cellule)	GOT (mU/ml)	ADP O		y/z	
			Témoin	Mesure	Témoin	Mesure
Essais n° 1	8,34 ($\pm 0,36$)	17 400	1,99 ($\pm 0,11$)	1,95 ($\pm 0,045$)	1,97 ($\pm 0,16$)	1,94 ($\pm 0,13$)
Essais n° 2	10,84 ($\pm 0,5$)	29 930	1,90 ($\pm 0,029$)	1,98	1,66 ($\pm 0,36$)	1,88
Essais n° 3*	11 ($\pm 0,34$)	31 570	2,36 ($\pm 0,21$)	2,24 ($\pm 0,06$)	2,76 ($\pm 0,012$)	2,85 ($\pm 0,13$)
	9,22 ($\pm 0,24$)	33 620	1,70 ($\pm 0,17$)	1,80 ($\pm 0,2$)	1,49 ($\pm 0,09$)	1,45 ($\pm 0,2$)

Rat Alimenté

BLEAU XXXXV : MESURE DE LA RESPIRATION DES MITOCHONDRIES DE FOIE DE RAT EN PRESENCE DE 1 μ mol. DE DBI AJOUTE AVANT L'ADDITION DU SUBSTRAT ($\bar{m} \pm 1s$).

	Protéines (mg dans la cellule)	GOT (mU/ml)	ADP O		y/z	
			Témoin	Mesure	Témoin	Mesure
Essais n° 1	7,9 ($\pm 0,18$)	28 552	1,77 ($\pm 0,08$)	1,39 ($\pm 0,16$)	1,92 ($\pm 0,1$)	1,42 ($\pm 0,24$)
Essais n° 2	7,18 ($\pm 0,16$)	43 181	2,08 ($\pm 0,26$)	1,74 ($\pm 0,12$)	1,76 ($\pm 0,24$)	1,85 ($\pm 0,28$)

14.3.2. Discussion

L'une des hypothèses souvent évoquée pour tenter d'expliquer le mécanisme d'action des biguanides hypoglycémiants, est une induction de la glycolyse anaérobie par inhibition de la phosphorylation oxydative. La gluconéogénèse (222) et la lipogénèse (442) seraient inhibées. Cet effet s'accompagne d'une augmentation d'acide lactique tissulaire et plasmatique. Nous avons discuté dans le paragraphe 13.2.5., l'origine de cette accumulation d'acide lactique.

On peut rapprocher l'effet des biguanides hypoglycémiants et des guanidines.

Celles-ci sont considérées par de nombreux auteurs comme des inhibiteurs de la phosphorylation oxydative (100, 368). LEHNINGER (268) classe les guanidines et quelques uns de leurs dérivés dans le troisième groupe des inhibiteurs spécifiques de la phosphorylation oxydative.

D'après HOLLUNGER (214), à une concentration de 0,02 M, elles inhibent la "prise" d'oxygène et la "prise" de phosphate par la chaîne respiratoire. Cette inhibition de l'oxydation couplée à la phosphorylation a lieu, tout en laissant les oxydations non phosphorylantes intactes. L'inhibition est levée par les découpleurs de la phosphorylation oxydative (2-4 dinitrophénol) ou les accepteurs d'électrons.

Le rapport $\frac{P}{O}$ n'est pas modifié avec des doses entraînant une inhibition de la respiration. L'activité de l'ATPase ne varie donc pas (135, 404, 442).

HOLLUNGER émet donc les hypothèses suivantes :

Il existerait un cofacteur oxydant, sensible aux guanidines, inconnu, nécessaire pour l'oxydation des nucléotides pyridiniques mitochondriaux réduits.

Les guanidines rendraient plus difficiles l'accessibilité mutuelle entre les cofacteurs oxydants.

L'inhibiteur n'est pas la guanidine elle-même, mais un produit qui n'a pas encore été isolé.

De même que les guanidines, il est possible que les biguanides aient un pouvoir élevé de captation des électrons et forment des cations. Une interaction avec un proton de transfert peut donc être envisagée. C'est ce que mettent en évidence les travaux de SCHAFER (404). Les biguanides semblent agir en se combinant stoechiométriquement avec d'autres intermédiaires lors de la séquence de couplage pour empêcher les réactions de transport d'électrons et de phosphate. Leur inhibition est voisine de l'inhibition causée par l'oligomycine, c'est à dire que les biguanides bloquent indifféremment le premier ou le deuxième site de phosphorylation selon la polarité de leur groupe prosthétique.

PRESSMAN(368) pense que l'action inhibitrice des biguanides se situe au niveau cytochrome b5 en favorisant l'absorption et la liaison du phosphate inorganique. SÖLING (442) observe effectivement une captation de phosphore inorganique plus élevée par le foie en présence de butylbiguanide (442).

L'inhibition de la phosphorylation oxydative par les biguanides hypoglycémisants est augmentée lorsque le pH varie d'une unité vers les pH alcalins (100). Elle se traduit par :

- Un ralentissement de la consommation d'oxygène de l'organe perfusé en présence de DBI (186, 187)
- Une inhibition de l'oxydation du pyruvate (453)
- Une concentration plus faible de certains métabolites dans le foie de cobaye perfusé en présence de 2×10^{-5} M de DBI : citrate, oxaloacétate, ATP (186, 185, 397), ADP, glutamate, 2 oxoglutarate, ammonium. Les concentrations de l'acétyl S-CoA sont augmentées. La quantité de malate intra-hépatique ne varie pas lorsque le foie est perfusé en présence de 0,02 M de DBI. Elle augmente lorsque le cobaye à jeûn 48 h est prétraité par le DBI avant la perfusion du foie par 2×10^{-5} M de DBI. La concentration en phosphoenolpyruvate est également fonction de la dose injectée à l'animal avant l'expérience. Après une dose de 12 mg/kg le phosphoenolpyruvate intra-hépatique est faiblement abaissé alors qu'après 18 mg/kg, il est augmenté.
- Un potentiel rédox intramitochondrial plus élevé
En effet, le rapport $\frac{3 \text{ hydroxybutyrate}}{\text{acétoacétate}}$ atteint 200 % dans le foie de cobaye perfusé en présence de DBI.

Par contre, le rapport $\frac{\text{lactate}}{\text{pyruvate}}$ n'est pas modifié ce qui semble incompatible avec la théorie de stimulation de la glycolyse anaérobie.

Selon HAECKEL (186) l'inhibition de la gluconéogénèse à partir du lactate s'expliquerait par une accumulation des équivalents réducteurs dans la mitochondrie, favorisant ainsi la synthèse du malate à partir de l'oxaloacétate, aux dépens du citrate et du phosphoenolpyruvate.

Au cours de nos essais, nous n'avons pas observé un découplage de la phosphorylation oxydative des mitochondries en présence de quantités élevées de DBI. Le DMB ne bloque pas la phosphorylation oxydative. L'oxydation du glutamate n'est pas altérée par les biguanides. Elle est même accélérée. Nos résultats rejoignent donc ceux d'IPAKTCHI (218).

Pour SCHAFER (405), cet effet est transitoire et correspondrait à une oxydation du NADH ou du cytochrome b lorsque les besoins en énergie sont déviés vers le transfert du biguanide à travers la membrane mitochondriale. En effet, en présence de doses thérapeutiques de DBI, la respiration tissulaire est accélérée alors qu'elle est ralentie à des doses toxiques (177, 251).

Il est donc peu probable que l'action hypoglycémiant des biguanides chez l'homme soit due uniquement à un effet sur la phosphorylation oxydative. Nous pouvons signaler à cet effet, que les réactions énergétiques des mitochondries de foie de rats diabétiques fonctionnent normalement (45, 51, 179, 192, 284). GROSS (179) attribue les variations du métabolisme des mitochondries qui ont parfois été évoquées au cours des diabètes anciens, à des dégénération tissulaires, secondaires à la maladie.

Bien que les observations au microscope électronique n'aient pas mis en évidence une altération de la structure mitochondriale, nos résultats in vitro sur un culot de mitochondries incubées en présence de DBI, pourraient être dûs, à une fragilisation des mitochondries par le biguanide. L'effet du DMB semble moins "agressif" que celui du DBI.

14.4. CONCLUSION

Les biguanides ne sont ni inhibiteurs, ni activateurs des isoenzymes isolées de la GOT. Les essais in vitro sur mitochondries de foie de rat, ont mis en évidence une augmentation de l'activité de la GOT mesurée sur un culot de mitochondries isolées en présence de DBI. Elle correspond à une sortie de la GOT des mitochondries, plus importante en présence de DBI.

La vitesse de captation de l'acide aspartique par les mitochondries et son métabolisme sont modifiés par les biguanides. Après incubation des mitochondries, en présence de biguanides et d'acide aspartique, nous avons pu constater une répartition différente de cet amino-acide entre le milieu intra et extramitochondrial, selon le biguanide utilisé.

Si la respiration des mitochondries n'est pas modifiée en présence de DMB, nous avons observé un découplage de la phosphorylation oxydative en présence de DBI.

Les résultats ainsi obtenus, montrent une action différente du DMB et du DBI sur les mitochondries de foie de rat, le DBI ayant pour effet une fragilisation de leur structure membranaire, ce que nous avons réussi à mettre en évidence pour la première fois.

C O N C L U S I O N S G E N E R A L E S

Ce travail comprend trois grandes parties :

Nous avons tout d'abord décrit les méthodes que nous avons mises au point et utilisées pour apporter une contribution à l'étude du mécanisme d'action des biguanides hypoglycémisants.

Dans ce but, nous avons séparé les 2-oxo-acides, sous forme de 2-4 dinitrophénylhydrazones, par chromatographie sur papier et par chromatographie sur couche mince de gel de silice. Nous avons retenu cette dernière méthode pour sa rapidité, sa simplicité et la séparation plus nette des spots. Les dosages sont effectués par colorimétrie après grattage et élution des spots. Nous avons été gênés par l'instabilité des 2-oxo acides, conduisant à la formation d'isomères au cours des phases successives d'extraction et de purification. Si cette méthode est suffisante pour l'étude des 2-oxo-acides lors de maladies métaboliques, elle ne l'est pas par contre pour une approche sérieuse du métabolisme intermédiaire. Seuls les dosages par voie enzymatique répondent aux critères exigés, de rapidité de la mesure, de spécificité et de sensibilité. Nous pensons également que la chromatographie en phase gazeuse pourrait être une méthode de choix pour obtenir un "profil" des 2-oxo acides dans les liquides biologiques. Elle n'a pas connu cependant le développement attendu, du fait du problème posé par la préparation et la stabilité des dérivés. Il semblerait que la formation de quinoxalines par condensation avec l'o.phenylène diamine assurerait une stabilité suffisante aux 2-oxo acides pour être mesurés par chromatographie en phase gazeuse.

Nous avons également contribué à mettre au point au laboratoire la séparation des amino-acides par chromatographie liquide sur colonne avec analyse automatique de l'éluat. Cette méthode bien connue à l'heure actuelle, a comme inconvénient une cadence d'analyses réduite car la durée de la séparation, de la régénération de la colonne et du dépouillement manuel des enregistrements, est encore très longue d'où l'intérêt des appareils récents de chromatographie liquide sous pression.

Dans le chapitre trois sont décrites les méthodes utilisées pour le dosage des enzymes (GPT, MDH, LDH) du glucose, des protéines, du magnésium, du calcium, du sodium, du potassium. Nous présentons dans chaque cas, la reproductibilité des techniques de dosage.

Enfin, nous avons utilisé et développé un certain nombre de techniques particulières telles que la mesure polarographique de l'oxygène pour suivre la respiration des mitochondries ainsi que la microscopie électronique (grâce à la collaboration du Professeur GRIGNON).

La deuxième partie de notre travail est consacrée à l'aspartate aminotransférase (GOT). Après un rappel sur les propriétés et les données actuellement connues sur les L-aspartate aminotransférases, nous décrivons notre expérience de la mesure de cette activité enzymatique.

Nous avons comparé les méthodes colorimétriques et les méthodes cinétiques, ainsi que les appareillages présents au laboratoire. Cette étude critique nous a permis les observations suivantes :

- . Les méthodes cinétiques de mesure des activités enzymatiques sont supérieures aux méthodes colorimétriques quant à la spécificité, à la sensibilité, à la précision et à la rapidité de la mesure dans la zone des valeurs de référence. Par contre, les méthodes colorimétriques adaptées en méthodes automatiques, conservent leur intérêt pour l'analyse en continu de l'activité enzymatique dans les liquides biologiques ou les préparations tissulaires.

Nous avons retenu la température de 37°C pour la mesure cinétique de l'activité enzymatique de la GOT.

La reproductibilité de la méthode est meilleure à cette température.

- . Nous avons attiré l'attention sur la cadence réelle d'analyses d'un appareillage automatique, qui doit tenir compte de la durée totale de la série d'analyses depuis la mise en route de l'appareil jusqu'à la transcription de résultats élaborés. Ainsi, nous avons souligné la mise en route très longue des appareils entièrement automatiques type Automate 5010 Eppendorf ou en flux continu Technicon, par rapport aux appareils semi automatiques tels que LKB 7400 ou l'ensemble microanalytique Eppendorf. En fait, seul le dosage lui-même bénéficie d'un degré d'automatisation très poussé. Le dépouillement d'un nombre important de résultats reste encore manuel.
- . Enfin, nous avons montré que la reproductibilité des appareils entièrement automatiques est meilleure par rapport aux méthodes manuelles ou semi-automatiques.

Nous avons discuté également les problèmes posés par le dosage de la GOT, dans le plasma, dans les érythrocytes et dans les tissus. Nous avons calculé la reproductibilité des méthodes dans chaque cas alors que cette précision n'apparaît pas toujours dans les travaux publiés dans ce domaine.

Après avoir montré que les résultats obtenus sur sérum et sur plasma étaient voisins, notre choix s'est porté finalement sur le plasma pour pouvoir séparer plus rapidement les cellules sanguines. Des études de la conservation de l'enzyme dans le plasma humain en fonction du temps et de la température, ont mis en évidence la bonne stabilité de l'activité de l'enzyme, 48 heures à température ambiante ou à $+4^{\circ}\text{C}$, et 30 jours à -30°C ou sous forme lyophilisée.

Ayant décrit la méthode de dosage de la GOT dans les érythrocytes, nous avons montré que l'activité de cette enzyme peut être mesurée sur des hématies lavées ou non. La corrélation entre les deux méthodes est bonne. Les résultats sont légèrement plus élevés dans un hémolysat d'hématies non lavées.

Pour l'extraction et la séparation des isoenzymes à partir du tissu hépatique, l'homogénéisation et le choix de la méthode de séparation sont très importants. Pour extraire totalement les isoenzymes de la GOT à partir du foie de rat, nous avons favorisé l'éclatement des mitochondries en employant des broyeurs mécaniques et un détergent, le Triton X 100. Nous avons étudié chaque étape du fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle ayant pour but l'isolement de mitochondries entières purifiées, contenant la GOT II. Nous avons précisé en particulier les conditions optimales pour l'homogénéisation du foie de rat. Nous avons obtenu dans les conditions décrites, un pourcentage de récupération de 98,6 % par rapport au premier surnageant, après élimination des débris cellulaires et des noyaux et seulement de 86 % par rapport au broyat total. Nous avons pu ainsi évaluer le pourcentage de pertes au cours de la première centrifugation. Deux lavages par la solution tampon d'extraction sont suffisants pour purifier les mitochondries.

Nous avons séparé les isoenzymes de la GOT par chromatographie sur colonne de cellulose anionique. Ce support, contrairement aux gels de dextrane échangeurs d'ions, ne fixe pas les protéines de façon irréversible. Les isoenzymes sont également séparées par électrophorèse sur acétate de cellulose gélatineux. L'utilisation de ce support est plus simple que les gels d'amidon, d'agar ou de polyacrylamide.

Nous avons employé la méthode chromatographique pour séparer et purifier des quantités plus importantes d'isoenzymes. L'électrophorèse a été utilisée au cours d'essais en série pour le dosage semi quantitatif des formes moléculaires de la GOT.

Toutes les étapes de l'extraction et de la séparation des isoenzymes doivent donc être soigneusement standardisées afin que l'on puisse, voire interpréter avec certitude les variations physiologiques, pathologiques ainsi que celles pouvant être dues à l'administration de biguanides.

Par ailleurs, pour discuter toutes les variations dues à ces médicaments, il était nécessaire de préciser auparavant les variations physiologiques érythrocytaires, tissulaires et plasmatiques, ce que nous avons fait à la fois du point de vue bibliographique et du point de vue expérimental.

Nous avons tout d'abord établi les valeurs de référence de la GOT érythrocytaire pour une population de 20 à 40 ans, comprenant 168 hommes et 154 femmes, à jeûn. Les valeurs sont légèrement plus élevées chez la femme (4426 mU/g d'hémoglobine) que chez l'homme (4254 mU/g d'hémoglobine). La prise d'un repas standard de 700 calories n'a pas d'influence sur l'activité de l'enzyme. Enfin, nous avons montré que les valeurs de la GOT dans le plasma et les érythrocytes étaient indépendantes. Cette observation a été confirmée chez des sujets diabétiques. En effet, la P.GOT n'est pas modifiée chez des diabétiques traités alors que la GOT érythrocytaire est supérieure aux valeurs établies pour la population témoin supposée saine. Il est probable qu'une concentration plus importante des amino-acides sanguins soit à l'origine de cette augmentation. La mesure de l'activité de la GOT érythrocytaire est appelée à d'autres applications, en particulier pour l'étude du vieillissement. C'est également un indice du niveau de la vitamine B₆.

En ce qui concerne les variations de P.GOT plasmatique, grâce à la collection importante d'échantillons (plus de 40 000) à notre disposition au Centre de Médecine Préventive, échantillons provenant de sujets supposés sains, nous avons pu montrer pour la première fois sur un aussi grand nombre de sujets, l'influence du sexe, de l'âge, de la prise de repas, de l'effort. Les valeurs de référence ont été établies chez des sujets à jeûn, du même âge et du même sexe. La distribution de la P.GOT n'étant pas gaussienne, nous présentons les valeurs pour 2,5,50 et 97,5% de la population. Les résultats les plus élevés ont été obtenus chez les enfants de 6 ans, les plus bas, entre 15 ans et 20 ans. Ils se stabilisent ensuite. Les valeurs sont supérieures chez les hommes sauf chez les enfants de 6 ans. Connaissant les fourchettes normales de la P.GOT, nous avons pu aborder l'étude de ses variations physiologiques.

Après avoir vérifié que l'activité de la P.GOT était indépendante de l'heure du prélèvement, nous avons étudié l'influence de la prise d'un repas. Les résultats sont variables selon sa composition.

Les valeurs obtenues après un repas dont la composition était variable, sont généralement supérieures à celles trouvées pour une population à jeûn, du même sexe, du même âge mais les différences ne sont pas statistiquement significatives, sauf pour la femme entre 50 et 60 ans. La prise d'un repas standardisé de 800 calories conduit à des résultats légèrement plus élevés par rapport à ceux obtenus chez des sujets à jeûn ou ayant pris un repas de composition variable. Ces résultats mettent l'accent sur la nécessité d'effectuer les prélèvements, en priorité chez des sujets à jeûn et secondairement, chez des sujets ayant pris un repas dont la composition est standardisée.

Enfin nous avons comparé les valeurs de la P.GOT chez des sujets dont l'activité était différente. Nous les avons regroupées selon l'âge, le sexe et la catégorie socio-professionnelle. Les résultats les plus élevés sont observés chez les salariés agricoles, puis chez les employés du bureau, les cadres moyens et les cadres supérieurs. Les différences sont plus grandes chez les femmes que chez les hommes. Ces résultats supposent une adaptation différente, non seulement en fonction de l'activité des sujets, mais également en fonction de leurs habitudes alimentaires.

L'étude approfondie de la GOT ayant été réalisée, nous avons pu aborder en connaissance de cause la troisième partie qui est une contribution à l'étude du mécanisme d'action des biguanides. Ces médicaments, essentiellement utilisés chez les sujets diabétiques, doivent avoir plusieurs points d'impact. Nous avons voulu vérifier certains d'entre eux au niveau de la gluconéogenèse, des transaminases et de la respiration de la mitochondrie.

Les résultats chez l'homme sain sont peu intéressants surtout à cause du petit nombre d'échantillons et de la non homogénéité du groupe étudié. En revanche, chez l'animal, in vivo et in vitro, nous apportons une contribution originale, l'étude de l'influence des biguanides sur les activités enzymatiques de la GOT et de la MDH n'ayant jamais été abordées jusqu'à présent à notre connaissance. Ces deux enzymes, localisées dans les deux compartiments intracellulaires, cytoplasmique et mitochondrial, interviennent indirectement dans la voie de la gluconéogenèse. La perméabilité de la membrane mitochondriale à l'acide oxaloacétique étant très faible, le passage de celui-ci à travers la membrane est assuré essentiellement par la GOT et par la MDH qui le transforment respectivement en acide aspartique et en acide malique. Ces deux acides peuvent traverser la membrane mitochondriale.

Les ions, magnésium et calcium, sont également répartis entre le cytoplasme et la mitochondrie et pourraient contrôler la gluconéogenèse. Enfin, les amino-acides et l'acide lactique sont des substrats utilisables pour la biosynthèse du glucose. Nous avons induit la gluconéogenèse par un jeûne de 48 heures. Avant d'aborder l'étude in vivo chez le rat, il était donc nécessaire de préciser l'effet du jeûne sur les paramètres étudiés. Nous avons ainsi établi des valeurs de référence chez le rat pour la glycémie, les cations, les protéines, les amino acides, l'acide lactique, la GOT et la MDH.

Après injection régulière de biguanide chez le rat, à jeûn pendant 48 heures, nous avons obtenu des résultats intéressants en ce qui concerne les deux enzymes auxquelles nous nous sommes attachés. L'augmentation de l'activité enzymatique de la GOT est supérieure à celle observée après un jeûne de 48 heures chez les rats témoins. La répartition des isoenzymes est également modifiée.

Alors que le pourcentage de GOT II est augmenté de 13 % après un jeûne de 48 heures, il est diminué de 26 % après injection de DBI et de 11 % après administration de DMB. L'activité spécifique de l'enzyme ne varie qu'après injection de DBI. L'activité de la MDH est également augmentée, mais seulement pour le DMB. Cette augmentation est supérieure à celle provoquée par le jeûne de 48 heures. En revanche, le DBI abaisse l'activité de la MDH.

Les autres paramètres mesurés varient également, en particulier les acides aminés et l'acide lactique qui après administration de DMB, sont toujours augmentés par rapport au témoin à jeûn. La concentration du magnésium n'est pas influencée par le jeûne ou le traitement par les biguanides. Le calcium, en revanche, est nettement abaissé au cours du jeûne et du traitement par le DMB. Sa concentration est encore plus basse après injection de DBI. Nos résultats sur la glycémie confirment ceux relevés dans d'autres travaux. Seul, le DMB a un effet hypoglycémiant marqué chez le rat. Nous avons constaté d'autre part une concentration plus élevée des protéines hépatiques après un jeûne de 48 heures. Après injection de biguanides, elle est supérieure à celle des témoins à jeûn, correspondant à un poids du foie plus élevé. Nous pensons que les biguanides pourraient donc exercer un effet inhibiteur sur la libération des amino-acides à partir des protéines du foie.

Enfin dans un dernier chapitre, notre étude in vitro tente d'expliquer certains des résultats obtenus chez le rat. Après avoir vérifié que les biguanides n'influençaient pas directement l'activité des isoenzymes cytoplasmique et mitochondriale, nous avons, en revanche, réussi à mettre en évidence que sur des mitochondries isolées, le DBI était capable de fragiliser ces structures membranaires et de favoriser la sortie de la GOT intra mitochondriale.

Puis, dans une dernière expérimentation, nous avons montré que les biguanides à des doses non physiologiques, modifiaient légèrement la respiration des mitochondries en accélérant la consommation d'oxygène. L'addition de DMB avant celle du substrat, ou après l'addition d'ADP (état 4 des mitochondries) n'avait pas d'influence sur la valeur du rapport $\frac{ADP}{O}$. En revanche, le DBI provoque un découplage de la phosphorylation oxydative.

Nos résultats semblent donc confirmer une inhibition de la gluconéogénèse à partir des amino-acides et de l'acide lactique, par les biguanides hypoglycémiants. Ces molécules entraînent également une sortie de la GOT mitochondriale qui pourrait être due à une chute du calcium. De même que la L.histidine et l'ATP, ce cation joue un rôle stabilisateur de membranes.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - AGID R., MARQUIE G.
C.R. Acad. Sc. Paris, 1969, 269, 1000
- 2 - AGID R., AMIEL S., GUILHEM A., MARQUIE G.
Path. Biol, 1971, 19, 727
- 3 - AIKAWA T., MATSUTAKA H., TAKEZAWA K.
Biochem. Biophys. Acta, 1972, 279, 234
- 4 - ALBANESE A.A., ORTO L.A., ZAVATTARO D.N.
Nutr. Rep. Intern, 1971, 3, 165
- 5 - ALLEYNE G.A.O., BESTERMAN H.S., FLORES H.
Clin. Sci, 1971, 40, 107
- 6 - ALTSCHULD F.A., KRUGER F.A.
Ann. N.Y. Acad. Sci, 1968, 148, 612
- 7 - AMADOR E., WACKER W.E.C.
Clin. Chem, 1962, 8, 343
- 8 - AMADOR E.
Clin. Chem, 1966, 12, 475
- 9 - AMADOR E., SALVATORE A.C.
Amer. J. Clin. Path, 1971, 55, 686
- 10 - AMELUNG D., HOFMANN L., OTTO L.
Germ. Med. Monthly, 1966, 11, 364
- 11 - AMIRI R.
Thèse, Faculté de Médecine, Lyon, 1962
- 12 - ANDERSON J.W.
Biochim. Biophys. Acta, 1970, 201, 236
- 13 - ANDERSON J.H., NICKLAS W.J., BLANK B., REFINO C., WILLIAMSON J.R.
In : Regulation of gluconeogenesis,
SOLING D, WILLMS B, THIEME G. Editeurs.
Verlag. STUTTGART. 1971
- 14 - ANTENER I.
Communication personnelle
- 15 - ANNING J.S.
Clin. Chem, 1966, 12, 217
- 16 - APPELS A., KATTERDAHL R., PROCTOR H., HUENICH K., FRIEDRICH H., BOLING H.D., CREUTZFELDT W.
Diabetologia, 1968, 4, 210
- 17 - ARDREY P.
Ann. Biol. Clin, 1949, 1, 407
- 18 - ARORA D.J.S.
Canad. J. Biochem, 1971, 49, 139
- 19 - ARRIO-DUPONT M., COURVIL I., DUIE P.
FEBS Letters, 1970, 11, 144
- 20 - ASCHKENASY A.
Nutrition et Hématopoïèse,
CWES. Editeurs. PARIS. 1971, 62
- 21 - AXELSSON H., EKMAN B., KNUTSSON D.
Technicon Symposia - Automation in Analytical Chemistry.
NEW-YORK, 1966, 603
- 22 - BABSON A.L.
Clin. Chim. Acta, 1962, 1, 199
- 23 - BABSON A.L., PHILLIPS G.
Clin. Chem, 1965, 11, 533
- 24 - BARKS B.E.C., DOONAN J., GAULDIE J., LAWRENCE A.J., VERNON C.A.
Europ. J. Biochem, 1968, 5, 528
- 25 - BARON P., GRIFFATON G., LOWY R., ARDOUIN B., DOUCET C.
Arch. Sci. Physiol, 1969, 24, 453
- 26 - BASSIS M., COLLET M.F.

- 27 - BERGLUND E.
Diabetologia, 1967, 3, 368
- 28 - BENCA G., THREURE C., HODANAU A.
Enzyme, 1971, 12, 574
- 29 - BERGQVIST K., KARLBERG B., LINDGREN S.
Acta. Med. Scand, 1972, 191, 203
- 30 - BERGTOLD P., BOLLI P., ARBENZ U., KEISER G.
Diabetologia, 1969, 5, 405
- 31 - BERGER W.
Med. Eye, 1969, 885, 1034
- 32 - BERGMAYER H.U., BERNT E.
In : Methods of enzymatic analysis.
Academic Press. Inc. Editeurs. NEW-YORK. 1965, 837
- 33 - BERGMAYER H.U., BERNT E.
In : Methoden der enzymatischen analyse.
BERGMAYER H.U. Editeur . 1970
Verlag Chemie, Weinheim Bergstr., 2, 1536
- 34 - BERGMAYER H.U., BERNT E.
In 33 p. 685
- 35 - BERGER H., MÜNCHOW H., WIRTHGEN B.
Acta. Biol. Med. Germ, 1968, 21, 683
- 36 - BERLET H.H.
Anal. Biochem, 1968, 22, 525
- 37 - BERRY M.M., KUN E.
Europ. J. Biochem, 1972, 27, 395
- 38 - BERRY J.P., WOOLF L.I.
Nature, 1952, 169, 202
- 39 - BERTLAND L.H., KAPLAN N.O.
Biochemistry, 1970, 9, 2653
- 40 - BERTRAND C.M.
Arch. Med. de Normandie, 1970, 1, 101
- 41 - BEST W.R., MASON C.C., BARRON S.S. SHEPHERD H.G.
Med. Clin. North. America, 1969, 53, 175
- 42 - BHARGAVA M.M., SREENIVASAN A.
Biochem. J, 1968, 108, 619
- 43 - BHATT I.N., BAJAJ V.
Indian. J. Biochem, 1969, 6, 62
- 44 - BISERTE G., DASSONVILLE B.
Clin. Chim. Acta, 1956, 1, 49
- 45 - BJÖRNTORP P., SCHERSTEN T., FAGERBERG S.E.
Diabetologia, 1966, 2, 346
- 46 - BLOCK W.D., CARMICHAEL R., JACKSON C.E.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med, 1964, 115, 941
- 47 - BLOCK R.J., DURRUM E.L., ZWIG G.
Paper chromatography and paper electrophoresis
Academic Press. Editeurs. NEW-YORK. 1958
- 48 - BONINATI J., ELLIOTT W.B., MILES P.G.
Anal. Biochem, 1969, 31, 399
- 49 - BOOTS L.R., CHRIST W.L., DAVIS D.R., BRUM E.W., LUDWICK T.M.
J. Dairy. Sci, 1969, 52, 211
- 50 - BOUAZIZ P.J.
Thèse, Faculté de Médecine, Paris, 1966
- 51 - BOYER A.A., CARTANO DE PERALTAMOS W., STOPPANI A.O.M., FOCAL F.
Proc. Soc. Exp. Biol, 1969, 132, 170
- 52 - BOYD J.W.
Biochem. J, 1961, 81, 434
- 53 - BOYD J.W.

- 54 - BOYD J.W.
Biochim. Biophys. Acta, 1966, 113, 302
- 55 - BOYDE T.R.C.
Biochem. J. 1968, 106, 581
- 56 - BOYDE T.R.C.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem, 1968, 6, 431
- 57 - BRAUNSTEIN A.E., KRITSMAN M.G.
Enzymologia, 1937, 2, 129
- 58 - BRAUNSTEIN A.E.
In : Enzymes and Isoenzymes Structure, Properties and Function
SHUGAR D. Editeur.
Academic Press. LONDON. 1970, 18, 101
- 59 - BRIN M., Mc KEE R.W.
Arch. Biochem. Biophys, 1956, 61, 384
- 60 - BROOKS L., OLKEN H.G.
Clin. Chem, 1965, 11, 748
- 61 - BURCH H.B.
In : Advances in Enzyme Regulation, WEBER G. Editeur
Pergamon Press LONDON. 1967, 3
- 62 - BURNS L.C.
Life Sci, 1970, 9, 18
- 63 - BURRIDGE N., CHURCHICH J.E.
J. Biol. Chem, 1970, 245, 6258
- 64 - BUTTERFIELD W.J.H., WHICHELOW M.J.
The Lancet, 1968, 785
- 65 - CABAUD P., LEEPER R., WROBLEWSKI F.
Amer. J. Clin. Pathol, 1956, 26, 1101
- 66 - CAHILL G.F.
New England. J. Med, 1970, 282, 668
- 67 - CAO A., DE VIRGILIIS S., LIPPI C., COPPA G.
Enzyme, 1971, 12, 42
- 68 - CARANAY W.T.
Amer. J. Clin. Pathol, 1962, 37, 445
- 69 - CASPARY W.F., CREUTZFELDT W.
Diabetologia, 1971, 7, 379
- 70 - CAVALLINI D., MONDOVI B.
Clin. Chim. Acta, 1957, 2, 312
- 71 - CHANCE B., WILLIAMS G.R.
J. Biol. Chem, 1955, 217, 383
- 72 - CHAPPELL J.B.
Brit. Med. Bull, 1968, 24, 150
- 73 - CHESK D.B., GRAYSTONE J.E.
Pediat. Res, 1969, 3, 433
- 74 - CHEN J.C. MARSTERS R., WIELAND R.G.
Diabetes, 1970, 19, 730
- 75 - CHENG S., WICHUDA-KOZAK C., MARTINEZ-CARRION M.
J. Biol. Chem, 1971, 246, 3623
- 76 - CHRISTEN P., RIORDAN J.F.
Biochemistry, 1970, 9, 3025
- 77 - CHURCHICH E., FARRELLY G.
J. Biol. Chem, 1969, 244, 72
- 78 - CHURCHICH J.E., HARPRING I.
Biochim. Biophys. Acta, 1965, 105, 575
- 79 - CLARKE B.P., DUNCAN I.J.P.
The Lancet, 1968, 20, 123
- 80 - CORNEN S.P., MAHURAN J.D., FULLER R.W.

- 81 - COHEN Y., COSTEROUSSE O.
IV Cong. Int. Diab. Fed. Médecine. Hygiène. Editeurs GENÈVE
1961, 745
- 82 - COHEN Y., COSTEROUSSE O.
Thérapie, 1961, 16, 109
- 83 - COHEN G.
Le métabolisme cellulaire et sa régulation.
HERMANN. Editeurs. PARIS. 1967
- 84 - COHEN P.P.
Feder. Proc, 1942, 1, 273
- 85 - COLEMAN J.O.D., PALMER J.M.
FEBS Letters, 1971, 17, 203
- 86 - CONNELLY J.L., MYRON D.R.
Biochemistry, 1971, 10, 102
- 87 - CONSTANTIA A., CONTULESCO A., IONESCO G., MILLESCO-GROHOLSKY J.
Arch. Maladies Prof. Med. Travail. Séc. Soc, 1971, 32, 647
- 88 - COPENHAVER J.H., SHIPLEY E.C., MEYER R.K.
Arch. Biochem, 1951, 34, 360
- 89 - COTLOVE E., HARRIS E.K., WILLIAMS G.Z.
Clin. Chem, 1970, 16, 1028
- 90 - COTTE J., COLLOMBEL C., CUIVRE A., PADIL L.
Rev. Franç. Et. Clin. Biol, 1967, 12, 496
- 91 - CURNIL I., ARRIO-DUPONT M.
Biochem. Biophys. Res. Comm, 1971, 43, 40
- 92 - CRAMP D.G.
J. Clin. Path, 1968, 21, 171
- 93 - CRISTOFARO R., EGLI R.H.
In : Chromatographie et méthodes de séparation immédiate.
Union des chimistes Héliques. Editeurs, 1966
- 94 - CZOK R., LAMPRECH T.W.
In : Methoden der Enzymatischen Analyse.
BERGMAYER H.U. Editeurs.
Verlag Chemie, Weinheim Bergstr, 1970
- 95 - CZYZYK A., TAWECKI J., SADOWSKI J., PONIKOWSKA I., SZCZEPANIK Z.
Diabetes, 1968, 17, 492
- 96 - DALIDOWICZ J.E., Mc DONALD H.J.
Biochemistry, 1965, 4, 1138
- 97 - DANCIS J., HUTZLER J., LEVITZ M.
Biochim. Biophys. Acta, 1963, 78, 85
- 98 - DANCIS J., LEVITZ M., MILLER S., WESTALL R.G.
Brit. Med. J, 1959, 1, 31
- 99 - DANCWSKI T.S.
Metabolism, 1967, 16, 865
- 100 - DAVIDOFF F.
J. Biol. Chem, 1971, 246, 4017
- 101 - DAVIDSON R.G., CORTNER J.A., RATTAZZI M.C.
Science, 1970, 169, 391
- 102 - DAVIES C.
In : Physical Techniques in Biological Research.
Academic Press. Editeurs. NEW-YORK, 1962, 4, 137
- 103 - DAWSON D.M., ALPER C.A., SEIDMAN J., MENDELSON J.
Ann. Int. Med, 1969, 70, 799
- 104 - DEBRY G., LAURENT J.
Helv. Med. Acta, 1969/1970, 35, 433
- 105 - DEBRY G., LAURENT J., CHERRIER P., VINIAKER H.
Rein et foie. Maladies de la nutrition, 1966, 2, 11
- 106 - DECKER L., RAU EM.
Proc.Soc. Exp. Biol. Med, 1963, 112, 144

- 107 - DE DUVE C.
In : *Methods in Enzymology*.
Academic Press. NEW-YORK, 1967, 10, 7
- 108 - DE SCHEPPER P., PARMENTIER G., VANDERHAEGHE H.
Biochim. Biophys. Acta, 1958, 28, 507
- 109 - DESMOND F.B.
New-Zealand. Med. J., 1971, 73, 18
- 110 - DIESTERHAFT M., ZHRAGO E., SALLACH H.J.
Biochem. Med., 1971, 5, 297
- 111 - DIETER M.P., ALTLAND P.D., HIGHMAN B.
Can. J. Physiol. Pharmacol., 1970, 48, 723
- 112 - DOUMAS B., BIGGS H.O.
Clin. Chim. Acta, 1969, 23, 75
- 113 - DUBACH U.C.
Schweiz. Med. Wschr., 1957, 87, 185
- 114 - DUJOVNE C.A., LEVY R., ZIMMERMAN H.J.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1968, 128, 561
- 115 - DUNCAN L.J.P., CLARKE B.F., MUNRO J.F.
Postgrad. Med. J., 1969 (May suppl)
- 116 - DUPONT M.
J. Chim. Phys. Physico-Chimie Biologique, 1965, 62, 701
- 117 - DUVAL D.
Thérapie, 1959, 14, 70
- 118 - DUVAL D.
Thèse, Faculté de Pharmacie, Paris, 1960
- 119 - DUWOOS H., BERTRAND C.M., HUSSON A., CRAMER J., TAYOT J.
Presse Médicale, 1970, 78, 23
- 120 - EBELING J., MEIJERS C.A.M., SPIJKERS J.B.F.
Clin. Chim. Acta, 1970, 27, 214
- 121 - ECKSTEIN B., HOCKMAN J.
Biochim. Biophys. Acta, 1969, 177, 50
- 122 - EFRON M.L.
Technicon Symposia, Automation in Analytical Chemistry, 1965, 637
- 123 - EICHBERG J., MOKRASCH L.C.
Anal. Biochem., 1969, 30, 386
- 124 - EICHEL H.J., BUKOVSKY J.
Nature, 1961, 191, 243
- 125 - ELOER J., VOIKMANN H.J., WAHRENBERG I., KLINGER W.
Arch. Toxikol., 1970, 27, 40
- 126 - EPSTEIN F.H., WHITTAK R.
Biochem. J., 1966, 99, 232
- 127 - ESTABROOK R.W.
In : *Methods in Enzymology*.
Academic Press. LONDON, 1967, 10, 41
- 128 - ESTRADA S.O., MONTAL M., CELIS H., CARABEZ A.
Europ. J. Biochem., 1970, 12, 227
- 129 - EVANGELOPOULOS A.E., KARNI-KATSADIMAS I., KALOGERAKOS T.
Enzymologia, 1971, 40, 37
- 130 - EVANGELOPOULOS A.E., KARNI-KATSADIMAS I., KALOGERAKOS T.
Résumé des communications. VII Cong. Int. de Chimie Clinique, 1969, 354
- 131 - EXTON J.H., CORBIN J.C., HARPER S.C.
J. Biol. Chem., 1972, 247, 4996
- 132 - EXTON J.H., PARK C.R.
J. Biol. Chem., 1968, 243, 4189
- 133 - EXTON J.H., PARK C.R.
J. Biol. Chem., 1969, 244, 1424
- 134 - FAHIMIS A.D., DROCHMANS P.
J. Microscopie, 1965, 4, 725

- 135 - FAICONE A.B., MAO R.
J. Biol. Chem, 1962, 237, 804
- 136 - FARRIAUX J.P., FONTAINE G., BISERTE G.
Ann. Pediat, 1968, 1, 20
- 137 - FELIG P., OWEN O.E., WAHREN J., CAHILL G.F.
J. Clin. Invest, 1969, 48, 584
- 138 - FELIG P., MARLISS E., POZEFSKY T., CAHILL G.F.
Amer. J. Clin. Nutr, 1970, 23, 986
- 139 - FELIX H., FREYRIA J.
Thérapeutique, 1970, 46, 61
- 140 - FINGERHUT B., FERZOLA R., MARSH W.H., LEVINE J.P.
Ann. N.Y. Acad. Sci, 1962, 1, 137
- 141 - FIORELLI C., FANTOL A.E., SALVADE P.
Résumé des communications, VII Cong. Int. de Chimie Clinique,
1969, 407
- 142 - FISCHER J., TAKAC S.L.
In : Quantitative Biology of Metabolism,
LOCKER A. Editeurs. NEW-YORK. Springer-Verlag,
1968, 182
- 143 - FISCHER I., WALTER H.
Biochim. Biophys. Acta, 1969, 184, 660
- 144 - FISCHER I., WALTER H.
J. Lab. Invest, 1972, 28, 742
- 145 - FISCHER U., HOMMEL H., KÖHLER E.
Acta. Biol. Med. Germ, 1971, 27, 499
- 146 - FLEISHER G.A.
Proc. Staff. Meetings. Mayo. Clinic, 1956, 31
- 147 - FLEISHER G.A., POTTER C.S., WAKIM K.G.
Soc. Exp. Biol. Med, 1960, 103, 229
- 148 - FLEISHER G.A.
Fed. Proc, 1960, 19, 6
- 149 - FLEISHER G.A., WAKIM K.G.
J. Lab. Clin. Med, 1963, 61, 98
- 150 - FLEISHER W.R.
In : Standard Methods of Clinical Chemistry,
1970, 6, 245
- 151 - FLORKIN M., SCHOFFENIELS E.
Biochimie et Biologie Moléculaire,
DESOER. Editeur, 1967
- 152 - FONDA L., JOHNSON R.J.
J. Biol. Chem, 1970, 245, 2709
- 153 - FREEDLAND R.A., MURAD S., HURVITZ A.I.
Fed. Proc, 1968, 27, 1217
- 154 - FREEDLAND R.A., SZEPESI B.
In : Enzyme synthesis and degradation in mammalian systems,
KARGER. Editeur. BALE, 1971, 103
- 155 - FREI J., BOREL C.
Ann. Biol. Clin, 1964, 22, 205
- 156 - FRENCH S.W.
Gastroenterologia, 1968, 54, 1106
- 157 - FRENCH S.W., TODOROFF T., NORUM M.L., IHRIG T.J.
Exp. Mol. Path, 1972, 16, 16
- 158 - FREUND H.
Ann. Biol. Clin, 1967, 25, 421
- 159 - FREYCHET P.
Path. Biol, 1970, 18, 499
- 160 - FRIEDMAN M.M., TAYLOR T.H.
In : Standard Methods of Clinical Chemistry,
1961, 3, 207

- 161 - FUHR J.
Technicon Symposia - Automation in Analytical Chemistry, 1969, 1, 1
- 162 - FURBISH F.S., FONDA M.L., METZLER D.E.
Biochemistry, 1969, 8, 5169
- 163 - GABRIELI E.R., ORFANOS A.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med, 1968, 27, 766
- 164 - GABRIELI E.R., ORFANOS A.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med, 1968, 128, 803
- 165 - GALTEAU M.M.
Conférence de Charleroi, 1972 (à paraître)
- 166 - GARBER A.J., BALLARD F.J.
J. Biol. Chem, 1970, 245, 2229
- 167 - GARBER A.J., HANSON R.W.
J. Biol. Chem, 1971, 246, 577
- 168 - GAYET J., MINN A., LEHR P.
Brain. Res, 1970, 18, 368
- 169 - GEPNER-WOZNIEWSKA M., CAEN F.
Rev. Franç. Et. Clin. Biol, 1960, 5, 375
- 170 - GIANFREDI L., PALESCANDILO R.
Boll. Soc. Ital. Biol. Sper, 1971, 66, 1004
- 171 - GIUSTI G., RUGGIERO G., CACCIATORE L.
Enzym. Biol. Clin, 1969, 10, 17
- 172 - GLASSY F.J., BLUMENFELD C.M. SACRAMENTO M.D.
Calif. Med, 1968, 108, 172
- 173 - GLYNN K.P., CAFARO A.F., FOWLER C.W., STEAD W.W.
Ann. Intern. Med, 1970, 72, 525
- 174 - GOLDBERG N.D., PASSONEAU J.
In 33
- 175 - GREEN D.E., LELOIR L.F., NOCITO V.
J. Biol. Chem, 1945, 161, 559
- 176 - GREEN D.E.
In : Comprehensive Biochemistry,
ELSEVIER C.Y. Editeur. AMSTERDAM,
1966, 14, 309
- 177 - GRIFFITHS D.E., HASLAM J.M.
Biochem. J, 1967, 104, 52
- 178 - GRODSKY G.M., KARAM J.H., PAVLATOS F.C., FORSHAM P.H.
Metabolism, 1963, 12, 278
- 179 - GROSS M.D., HARRIS S., BEYER R.E.
Horm. Metab. Res, 1972, 4, 1
- 180 - GRÖTSCH H., HAJDU P.
Z. Klin. Chem. Lin. Biochem, 1971, 9, 123
- 181 - GUISSARD D., GONAND J.P., DEBRY G.
Clin. Chim. Acta, 1971, 35, 493
- 182 - GYR K., BERGER W., GOSCHKE H., STALDER G.A.
Helv. Med. Acta, 1971, 35, 521
- 183 - HACKEL E., HOPKINSON D.A., HARRIS H.
Ann. Hum. Genet, 1972, 35, 491
- 184 - HAECKEL R., HAECKEL H.
Biochemistry, 1968, 7, 3803
- 185 - HAECKEL R., HAECKEL H.
In : Regulation of gluconeogenesis,
SOLING H.D. WILLMS B. THIEME G. Editeurs
Verlag. STUTTGART, 1971, 127
- 186 - HAECKEL R., HAECKEL H., ANDERER M.
Biochem. Pharmacol, 1971, 20, 1053

- 187 - HAECKEL R., HAECKEL H.
Diabetologia, 1972, 8, 117
- 188 - HAGENBUCH O.E.
Bull. Coll. Amer. Pathol, 1966, 20, 85
- 189 - HAGENFELDT L., BLOMSTRAND R.
Acta. Chem. Scand, 1965, 19, 251
- 190 - HAGIHARA B.
Biochim. Biophys. Acta, 1961, 46, 134
- 191 - HAMM R., KÖRMEYER L., GANTNER G.
J. Food. Sci, 1969, 34, 446
- 192 - HARANO Y., DE PALMA R.O., LAVINE K., MILLER M.
Diabetes, 1972, 21, 257
- 193 - HARRIS E.K., KANOFKY P., SHAKARJI G., COTLOVE E.
Clin. Chem, 1970, 16, 1022
- 194 - HASLAM J.M., KREBS H.A.
Biochem. J, 1968, 107, 659
- 195 - HASLAM J.P., GRIFFITHS D.E.
Biochem. J, 1968, 109, 921
- 196 - HEINZ F.
In : Praktische Enzymologie,
SCHMITZ F.W. Editeurs.
Verlag Hans Huber. STUTTGART, 1967
- 197 - HEISTAND R.N.
Anal. Chim. Acta, 1967, 39, 258
- 198 - HEMS D.A., BROSHAN J.T.
Biochem. J, 1970, 120, 105
- 199 - HENRY R.J., CHIAMORI N., ORVILLE J., GOLUB OJ., BERKMAN S.
Amer. J. Clin. Path, 1960, 34, 381
- 200 - HENRY R.J.
In : Clinical Chemistry Principles and Techniques,
HARPER. and ROW. NEW-YORK,
1964, 508
- 201 - HENSON C.P., CLELAND W.W.
Biochemistry, 1964, 2, 338
- 202 - HEROUX O., PIERRE J.S.
Amer. J. Physiol, 1957, 188, 163
- 203 - HERZFELD A., GREENGARD O.
Biochim. Biophys. Acta, 1971, 237, 88
- 204 - HIBBS C.N., COLES E.H.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med, 1965, 118, 1059
- 205 - HIGHMAN B., ALTLAND P.D.
Amer. J. Physiol, 1960, 199, 981
- 206 - HOCHELLA N.J.
In 33
- 207 - HOCHMAN J., SCHENKER J.C.
J. Clin. Endocrin. Metabolism, 1969, 29, 112^
- 208 - HOFFMAN N.E., KILLINGER T.A.
Anal. Chem, 1969, 41, 162
- 209 - HOGEBLOOM G.H., SCHNEIDER W.C.
J. Biol. Chem, 1953, 204, 233
- 210 - HOGEBLOOM G.H.
In : Methods in Enzymology,
Academic Press, NEW-YORK, 1955, 1, 16
- 211 - HOKHIST H.J.
In 33
- 212 - HOLCOMB I.J., McCANN D.S., BOYLE A.J.

- 213 - HOLLOBAUGH S.L., RAO M.B., KRUGER F.
Diabetes, 1970, 19, 45
- 214 - HOLLUNGER G.
Acta. Pharmacol. Toxicol, 1955, 11, 1
- 215 - HORII Z.I., MAKITA M., TAMURA Y.
Chem. Ind, 1965, 34, 1494
- 216 - HORNBRONK K.R., BURCH H.B., LOWRY O.H.
Biochem. Biophys. Res. Comm, 1965, 18, 206
- 217 - HYVARINEN A., NIKKILA E.
Clin. Chim. Acta, 1962, 7, 140
- 218 - IPAKTCHI M.
Thèse, Faculté des Sciences, Paris, 1966
- 219 - ITOH H., SREERE P.A.
Anal. Biochem, 1970, 35, 405
- 220 - ITOH H., SREERE P.A.
Clin. Chem, 1971, 17, 86
- 221 - JACOBS A., CAVILL I.A.J., HUGHES J.W.P.
Amer. J. Clin. Nutr, 1968, 21, 502
- 222 - JANGAARD N.O., PEREIRA J.W., PINSON R.
Diabetes, 1968, 17, 96
- 223 - JENKINS W.T., YPHANTIS D.A., SIZER I.W.
J. Biol. Chem, 1959, 234, 51
- 224 - JENKINS W.T., TAYLOR R.T.
J. Biol. Chem, 1965, 240, 2907
- 225 - JENKINS W.T., D'ARI L.
J. Biol. Chem, 1966, 241, 2845
- 226 - JEREBZOFF-QUINTIN S.
C.R. Sci. Nat, 1967, 264, 2003
- 227 - JOHNSON H., WATERHOUSE C., ROCHESTER N.Y.
Arch. Int. Med, 1968, 122, 367
- 228 - JUCHAU M.R., FOUTS J.R.
Biochem. Pharm, 1967, 16, 155
- 229 - JUNGNER G.
Scand. J. Clin. Lab. Invest, 1957, 10, 280
- 230 - JUUL P.
Clin. Chem, 1967, 13, 416
- 231 - KACHMAR J.F.
In : Fundamentals of Clinical Chemistry.
TIETZ N.W. Editeur. WB SAUNDERS COMPANY. LONDON, 1970
- 232 - KAESER H., KAESER R., LESTRADET H.
Rev. Franç. Et. Clin. Biol, 1959, 4, 138
- 233 - KARMEN A.
J. Clin. Invest, 1955, 34, 131
- 234 - KARMEN A., WROBLEWSKI F., LA DUE J.S.
J. Clin. Invest, 1955, 34, 126
- 235 - KÄSER H.
Clin. Chim. Acta, 1961, 6, 337
- 236 - KATTERMANN R., APPELS A., HUBRICH K., PROSCHKE H., SÖLING H.D., CREUTZFELDT V.
Diabetologia, 1968, 4, 221
- 237 - KEEN H., JARRETT R.J.
Postgrad. Med. J, 1968, 44, 466
- 238 - KEENEY M.
Anal. Chem, 1957, 29, 1489
- 239 - KING J.
In : Practical Clinical Enzymology.
VAN NOSTRAND D. Editeur. London, 1965, 132

- 240 - KING J.
Clin. Biochem, 1967, 1, 42
- 241 - KLINGER W., MULLER D., TILLER R., RUDOLPH G.
Arch. Toxikol, 1968, 23, 167
- 242 - KLUGE A., HAUG H.
Z. Gesam. Blutvorschung, 1970, 21, 20
- 243 - KNOX W.E., GREENGARD O.
In : Advances in Enzyme regulation,
WEBER G. Editeur. Pergamon Press, LONDON, 1964, 3
- 244 - KOCHAKIAN C.D., ENDAHL B.R., ENDAHL G.D.
Amer. J. Physiol, 1959, 197, 129
- 245 - KOJ A., ZGLICZYNSKI J.M., FRENO J.
Clin. Chim. Acta, 1960, 5, 339
- 246 - KOPELOVICH L., SWEETMAN L., NISSELBAUM J.S.
J. Biol. Chem, 1970, 245, 2011
- 247 - KOUDELA K., SOVA Z., VOSYKA V.
Zentralblatt für Veterinärmedizin, 1969, 16, 215
- 248 - KOUDELA K., SOVA Z., HOFMAN J.
Zentralblatt für Veterinärmedizin, 1970, 17, 471
- 249 - KREBS H.A.
In : Advances in Enzyme regulation,
WEBER G. Editeur. Pergamon Press. NEW-YORK, 1966, 4, 339
- 250 - KREBS H.A., VEECH R.L.
In : Pyridine nucleotide dependent dehydrogenases,
SUND H. Editeur. Springer Verlag. BERLIN, 1970
- 251 - KREBS H.A.
In : Regulation of gluconeogenesis,
SÖLING H.D. WILLMS B. Editeurs. G.Thieme. Verlag . STUTTGART, 1971
- 252 - KREISBERG R.A., BIRMINGHAM M.D.
Diabetes, 1968, 17, 488
- 253 - KREISBERG R.A. PENNINGTON L.F., BOSHELL B.R.
Diabetes, 1970, 19, 64
- 254 - KREISBERG R.A. SIEGAL AM., OWEN W.
J. Clin. Endocrin. Metabolism, 1972, 34, 876
- 255 - KRISHNASWAMY K.
Int. J. Vit. Nutr. Res, 1971, 41, 240
- 256 - KRUGER F.A., ALTSCHULD R.A., HOLLOBAUGH S.L., JEWETT B.
Diabetes, 1970, 19, 50
- 257 - KRUSKAL-WALLIS W.A.
In : A course in nonparametric statistics,
HAJEK J. Editeur. Holden Day. SAN FRANCISCO, 1969
- 258 - KUN E.
In : Citric acid cycle,
LOWENSTEIN J.M. Editeur. Dekker Marcel. NEW-YORK, 1969
- 259 - LA DUE J.S., WROBLEWSKI F., KARMEN A.
Science , 1954, 120, 497
- 260 - LANG K.
In : Biochemie der Ernährung 2 Auflage,
STEINKOPFF D. Editeur. Verlag. DARMSTADT, 1970
- 261 - LANG N., MASSARAT S.
Klin. Wochr, 1965, 43, 597
- 262 - LANGSLET A.
Europ. J. Pharmacol, 1971, 13, 292
- 263 - LARSSON-COHN U.
Brit. Med. J, 1965, 1, 1414
- 264 - LAUDHAN G., HARTMANN E.
Klin. Wochr, 1970, 48, 1010

- 5 - LE BACQ H.
Louvain Med, 1970, 89, 561
- 6 - LEE S., TORACK M.
J. Cell. Biol, 1968, 32, 725
- 7 - LEE S.H.
Histochimie, 1969, 19, 99
- 8 - LEENINGER A.L.
In : Biochemistry Worth Publishers,
Inc. NEW-YORK, 1970, 398
- 9 - LESQUIRE B., VOLPIN P.
Biochimie, 1971, 53, 391
- 0 - LEVINE J.B., HILL J.B.
Technicon Symposia - Automation in Analytical Chemistry, 1965, 569
- 1 - LIPPI U., GULDI G.
Clin. Chim. Acta, 1970, 28, 431
- 2 - LO C.H., STELSON H.
Anal. Biochem, 1972, 45, 331
- 3 - LOEGERING D.J., CRITZ J.B.
Can. J. Physiol. Pharmacol, 1968, 46, 627
- 4 - LOEGERING D.J., CRITZ J.B.
Amer. J. Physiol, 1971, 220, 100
- 5 - LOMARTS A.J.P.F., PETERS H.J.
Clin. Chim. Acta, 1971, 35, 257
- 6 - LONGSHAW I.D., BOWEN N.L., POGSON C.I.
Europ. J. Biochem, 1972, 25, 366
- LOOMIS M.E.
J. Lab. Clin. Med, 1961, 57, 966
- 0 - LOWY R., GRIFFATON G., BARON P.
Arch. Scand. Physiol, 1970, 24, 109
- 9 - LOWRY O.H., ROSEBROUGE N.J., LEWISFARR A., RANDALL R.J.
J. Biol. Chem, 1951, 192, 265
- 0 - LUFT J.H.
J. Biophys. Biochem. Cytol, 1961, 2, 409
- 1 - LUYCKX A., LEFEBVRE P.
Ann. Endocrin. Paris, 1969, 30, 717
- 2 - LYNDSOE J. TRAP-JENSEN J.
Brit. Med. J, 1969, 2, 224
- 3 - MACHADO E.A., PORTA E.A., HATROFT W.S., HAMILTON F.
Lab. Invest, 1971, 24, 13
- 4 - MACKERER C.R., PAQUET R.J., MEHLMAN M.A., TOBIN R.B.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med, 1971, 137, 992
- 5 - MACHE S.C., PHILLIPS A.T.,
Biochemistry, 1971, 10, 3397
- 6 - MANUCCI P.M., DIOGUARDI N.
Clin. Chim. Acta, 1966, 14, 215
- 7 - MARBACH E.P., WEIL M.H.
Clin. Chem, 1967, 13, 314
- 8 - MARCO R., SEBASTIAN J., SOLS A.
Biochem. Biophys. Res. Comm, 1969, 34, 725
- 9 - MARCO R., SOLS A.
in : Metabolic regulation and enzyme action, SOLS A. GRISOLIA S. Editeurs, Academic Press LONDON 1970
- 0 - MARGOLIS A., BUGAYOWA I., MARASEK L.
Acta. Med. Pol, 1965, 6, 505
- 1 - MARINO G., SCARDI V., ZITO R.
Biochem. J, 1966, 99, 595
- 2 - MARINO G., GRECO A.M., SCARDI V., ZITO R.
Biochem. J, 1966, 99, 589
- 3 - MARINO G., DE ROSA M., BUONOCORE V., SCARDI V.

- 294 - MARINO G., PATERNO M., DE ...
FEBS Letters, 1972, 21, 53
- 295 - MARQUE G., AGID R.
C.R. Soc. Biol, 1969, 163, 2746
- 296 - MARQUE G. AGID R., AMIEL S., GUILHEM A.
C.R. Soc. Biol, 1970, 164, 648
- 297 - MARTINEZ-CARRION M., TURANO C., CHIANCONE E., BOSSA F., GIARTOSIO A., RIVA F., FASELLA
J. Biol. Chem, 1967, 242, 2397
- 298 - MARTINEZ-CARRION M., TIEMEIER D.
Biochemistry, 1967, 6, 1715
- 299 - MARTINEZ-CARRION M., MICHUDA C.
Résumé des communications FEBS Prague 1968
- 300 - MARTINEZ-CARRION M.
Résumé des communications FEBS Madrid 1969 24
- 301 - MARTINEZ-CARRION M., PETERSON D.
In : Metabolic regulation and enzyme action,
SOLS A. GRISOLIA S. Editeurs. Academic Press. LONDON, 1970
- 302 - MARTINEZ-CARRION M., TIEMEIER D.C., PETERSON D.L.
Biochemistry, 1970, 9, 2574
- 303 - MASAMITSU K., SHOZO N., SACHIE T.
Rinsho-Kensa, 1964, 8, 737
- 304 - MASSARAT S., KÖBLER H.
Arch. Klin. Med, 1969, 216, 285
- 305 - MATHIAS W.
Naturwissenschaften, 1954, 41, 17
- 306 - MAXFIELD M., MULTANI S.,
Technicon Symposia - Automation in Analytical Chemistry,
1965, 274
- 307 - Mc GIVAN J.D., BRADFORD N.M., CHAPPELL J.B.
FEBS Letters, 1969, 4, 247
- 308 - MEDINA J.M., SANCHEZ-MEDINA F., MAYOR F.
Rev. Esp. Fisiol, 1971, 27, 253
- 309 - MEHNERT H., SADOW H.S.
In : Oral hypoglycaemic agents pharmacology and therapeutics,
CAMPELL G.D. Editeur. Academic Press. LONDON, 1969
- 310 - MERRILL J.M., LEMLEY-STONE J., MENELLY G.R.
Amer. J. Physiol, 1957, 190, 522
- 311 - MEYER F., IPAKTCHI M., CLAUSER H.
Nature, 1967, 213, 203
- 312 - MEYER F. IPAKTCHI M., CLAUSER H.
J. Diabetol, 1967, 341, 345
- 313 - MICHUDA C.M., MARTINEZ-CARRION M.
Biochemistry, 1969, 8, 1095
- 314 - MICHUDA C., MARTINEZ-CARRION M.
J. Biol. Chem, 1969, 244, 5920
- 315 - MICHUDA C.M., MARTINEZ-CARRION M.
J. Biol. Chem, 1970, 245, 262
- 316 - MILETIC D., STANULOVIC M., BOGDANOV B., OBRADOVIC D.
Helv. Paediat. Acta, 1969, 24, 183
- 317 - MILLER R.S., LANE M.D.,
J. Biol. Chem, 1968, 243, 6041
- 318 - MILLER R.S., MILDVAN A.S., CHANG H.C., EASTERDAY R.L., HARUYAMA H., LANE M.D.
J. Biol. Chem, 1968, 243, 6030
- 319 - MINN A.
Thèse, Faculté des Sciences de Nancy, 1970

- 320 - MIROUZE J. BERNARD R., JENARD F.
J. Med de Pontpellier, 1969, 4, 337
- 321 - MOHRE-LUNDHOLM E., SVENYR N., VAMOS N.
Scand. J. Clin. Lab. Invest, 1965, 17, 501
- 322 - MOLANDER D.W., WROBLEWSKI F., LA DUE J.S.
J. Lab. Clin. Med, 1955, 46, 841
- 323 - MOORE S., STEIN W.H.
J. Biol. Chem, 1951, 192, 663
- 324 - MOORE S., STEIN W.H.
J. Biol. Chem, 1954, 211, 895
- 325 - MOORE J.J., SAX S.M.
Clin. Chem, 1969, 15, 730
- 326 - MORQENSTERN S., OKLANDER M., AUERBACH J., KAUFMAN J., KLEIN B.
Clin. Chem, 1966, 12, 95
- 327 - MORQENSTERN S., KAUFMAN J.H., KLEIN B.
Clin. Chem, 1967, 13, 270
- 328 - MORRISON J.C., WHYBREN D.W., WISER W.L., BUCOVAZ E.T., FISH S.A.
Amer. J. Obstet. Gynec, 1971, 110, 619
- 329 - MOWBRAY J., OTTAWAY J.H.
Biochem J, 1970, 120, 171
- 330 - MUKERJI S.K., TING I.P.
Arch. Biochem. Biophys, 1971, 143, 297
- 331 - MUMTONI S., DUCE M., CORSINI G.V.
Life Sciences, 1970, 2, 241
- 332 - MURPHY P.J., WICK A.N.
J. Pharm. Sci, 1968, 57, 1125
- 333 - NAKAMURA R.M., MAGSASAY G.M., KUNITAKE .
Clin. Chem, 1965, 11, 846
- 334 - NEISH W.J.P.
In : Methods of biochemical analysis
Intersciences, Editeur. NEW-YORK.
1957, 5, 107
- 335 - NEVILLE J.F., GELDER R.L.
Amer. J. Clin. Path, 1971, 55, 152
- 336 - NICLOUX M.
C.R. Acad. Sci, 1930, 191, 259
- 337 - NISONOFF A., BARNES F.J.
J. Biol. Chem, 1952, 199, 713
- 338 - NISONOFF A., HENRY S.S., BARNES F.W.
J. Biol. Chem, 1952, 199, 699
- 339 - NISSELBAUM J.S., BODANSKY O.
Science, 1965, 149, 195
- 340 - NISSELBAUM J.S. BODANSKY O.
J. Biol. Chem, 1966, 241, 2661
- 341 - NISSELBAUM J.S.
Ann. Biochem, 1968, 23, 173
- 342 - NISSELBAUM J.S., BODANSKY O.
Cancer. Res, 1969, 29, 360
- 343 - NISSELBAUM J.S. KOPELOVITCH L.
FEBS Letters, 1971, 17, 315
- 344 - NOLL F.
In : Methoden der enzymatischen analyse.
BERGMAYER H.U. Editeur. Verlag Chemie,
Weinheim Bergstr. 1970
- 345 - NOMENCLATURE DES FORMES MULTIPLES DES ENZYMS - RECOMMANDATIONS 1971
Biochimie, 1972, 54, 123
- 346 - NOVAK J., FIERO K., SEIFERT C., BONILLA C.A.
Comp. Biochem. Physiol, 1970, 36, 619

- 347 - O'HALLORAN M.W., STUDLEY-RUXTON J., WELLEY M.L.
Clin. Chim. Acta, 1970, 27, 35
- 348 - OLSEN C.
Clin. Chim. Acta, 1971, 33, 293
- 349 - OSTERN P.
Z. Physiol. Chem, 1933, 218, 160
- 350 - OTANI T.T., MORRIS H.P.
In : Advances in enzyme regulation,
WEBER G. Editeur. Pergamon Press. NEW-YORK, 1964, 3
- 351 - OTANI T.T., MORRIS H.P.
Cancer. Res, 1968, 28, 2092
- 352 - OUCHENIKOV Y.A., KURICHKIN A.A., EGOROV T.A., ABDULAEV M.O., KISELEV A.P., MODYANOV M.H., GRISHIN VINOGRADOV M.I., GELMAN M.Y., ALDANOVA N.A. LIPKIN V.M. BRAUNSTEIN A.E., POLYANOVSKY O.L.
FEBS Letters, 1971, 12, 194
- 353 - OWEN O.E., FELIG P., MORGAN A.P., WAHREN J., CAHILL G.F.
J. Clin. Invest, 1969, 48, 574
- 354 - OZAWA K., KITAHARA O., WIZUKAMI T., YAMAOKA Y., KAMANO T., TAKEDA H., TAKASAKI H., HONJO I.
Clin. Chim. Acta, 1972, 38, 385
- 355 - PACE M.M., GRAHAM E.F.
Biol. Reprod, 1970, 3, 140
- 356 - PASSEN S., GENNARO W.
Amer. J. Clin. Path, 1966, 46, 69
- 357 - PASSONNEAU J.V.
In 33
- 358 - PASSONNEAU J.V., LOWRY O.H.
In 33
- 359 - PATEL D.P., STOWERS J.M.
Lancet, 1964, 2, 282
- 360 - PATRAMANI I., KATSIRI K.
Europ. J. Biochem, 1969, 11, 28
- 361 - PATRICK S.T.
Canad. J. Biochem, 1966, 44, 27
- 362 - PERSSIRA J.N., JANGAARD N.O., PINSON E.R.
Diabetes, 1967, 16, 869
- 363 - PETERS M.A., FOUTS J.R.
Anal. Biochem, 1969, 30, 299
- 364 - PETERSON DL., MARTINEZ-CARRION M.
J. Biol. Chem, 1970, 245, 806
- 365 - PIEZ K.A., MORRIS L.
Ann. Biochem, 1960, 1, 187
- 366 - POLIKARPOVA L.I.
Résumé des communications, FEBS Prague 1968, 252
- 367 - PORTA E.A., De La INGLÉSIA F., HARTROFT W.S.
Lab. Invest, 1968, 18, 283
- 368 - PRESSMAN B.C.
J. Biol. Chem, 1963, 238, 401
- 369 - RANKE E., TAUBER S.A., HORCNICK A., RANKE B., GOODHART R.S., CHOW B.F.
J. Geront, 1960, 15, 41
- 370 - RASMUSSEN H.
J. Chrom, 1967, 27, 142
- 371 - REED A.H., CANTON D.C., WINKELMAN J.W., BHASIN I.P., HENRY R.J., PILEGGI V.J.
Clin. Chem, 1972, 18, 57
- 372 - REITH A., MÖRN E., SCHMIDT F.W., SCHMIDT E., WILDHIRT E.
Klin. Wschr, 1964, 42, 909

- 373 - REINKEN K., HOHENAUER L., ZIEGLER E.E.
Clin. Chim. Acta, 1972, 36, 270
- 374 - RENDON A., WAKSMAN A.
Arch. Int. Phys. Bioch, 1969, 77, 553
- 375 - REITMAN S., FRANKEL S.
Amer. J. Clin. Pathol, 1957, 26, 50
- 376 - RICHTERICH R.
Chimie Clinique, Théorique et Pratique,
DOIN. Editeur. Paris, 1967, 339
- 377 - RICHTERICH R.
Chimie Clinique, Théorique et Pratique,
DOIN. Editeur. Paris, 1967, 480
- 378 - RIGAS A.N., BITTLES A.H., HADDEY D.R., MONTGOMERY D.A.D.
Brit. Med. J., 1971, 4, 25
- 379 - RIVIERE J., LATAPIE J.L., LAUBIE B., ROGER P., EMPERAIRE J.C.
Gazette Médicale de France, 1968, 75, 1215
- 380 - ROGINSKY S., BARNETT L.
Amer. J. Clin. Nutr, 1966, 19, 223
- 381 - ROGNSTAD R., KATZ J.
Biochem. J, 1970, 116, 483
- 382 - RONKAINEN P., SUOMALAINEN H.
Suom. Kemistilehti, 1964, B37, 104
- 383 - RONKAINEN P.,
Suom. Kemistilehti, 1964, B37, 209
- 384 - RONKAINEN P., BRUMMER S.
J. Chrom, 1967, 27, 374
- 385 - RONKAINEN P., BRUMMER S., SUOMALAINEN H.
J. Chrom, 1967, 28, 443
- 386 - RONKAINEN P.
J. Chrom, 1967, 28, 263
- 387 - RONKAINEN P.
J. Chrom, 1967, 28, 253
- 388 - RONKAINEN P., BRUMMER S.
J. Chrom, 1967, 28, 259
- 389 - RONKAINEN P.
J. Chrom, 1967, 28, 440
- 390 - ROOBOL A., ALLEYNE G.A.O.
Biochem. J, 1972, 129, 231
- 391 - ROSE D.P., STRONG R., ADAMS P.W., HARDING P.E.
Clin. Sci, 1972, 42, 465
- 392 - ROSENBERG J.C., RUSH B.F.
Clin. Chem, 1966, 12, 299
- 393 - ROSENTHAL H.L., SOBIESZCZANSKA W.A.
Analyt. Chem, 1970, 34, 591
- 394 - RUBIN E., LIEBER C.S.
Fed. Proc, 1967, 26, 1458
- 395 - RUMSEY T.S., NOLLER C.H., BURNS J.C.
J. Dairy. Sci, 1964, 47, 1418
- 396 - SABLE R., AGID R.
C.R. Soc. Biol, 1969, 163, 2200
- 397 - SANDLER R., VINNICK L., FREINKEL M.
Life Sciences, 1968, 1, 459
- 398 - SARKAR N.K., SAUER F.
Résumé des communications, FEBS Prague, 1968, 86
- 399 - SARKAR N.K.
Life Sciences, 1970, 2, 667

- 400 - SATO T., MIWA T., TAUCHI A.
Gerontologia, 1970, 16, 368
- 401 - SAX S.M., MOORE J.J.
Clin. Chem, 1967, 13, 175
- 402 - SAX S.M., MOORE J.J.
Standard Methods of clinical chemistry, 1970, 6, 149
- 403 - SCANDURRA R., CANNELLA C.
Europ. J. Biochem, 1972, 26, 196
- 404 - SCHAFER G.
Biochim. Biophys. Acta, 1969, 172, 334
- 405 - SCHAFER G., BOJANOWSKI D.
Europ. J. Biochem, 1972, 27, 364
- 406 - SCHAFFERT R.R., KINGSLEY C.R., GETCHELL C.
Clin. Chem, 1964, 10, 519
- 407 - SCHATZ H., DOCI S., HOFER R.
Diabetologia, 1972, 8, 1
- 408 - SCHEID B., ROTH J.S.
In : Advances in Enzyme regulation,
WEBER G. Editeur. Pergamon Press, NEW-YORK, 1964, 3
- 409 - SCHEID B., MORRIS H.P., ROTH J.S.
J. Biol. Chem, 1965, 240, 3016
- 410 - SCHMIDT E., SCHMIDT F.W.
Biol. Gastroent, 1961, 4, 15
- 411 - SCHMIDT E., SCHMIDT F.W.
Enzym. Biol. Clin. 1962, 2, 223
- 412 - SCHMIDT E., SCHMIDT F.W., HERFARTH C.H.
Klin. Wochr, 1962, 40, 22
- 413 - SCHMIDT E., SCHMIDT F.W., HORN H.D., GERLACH U.
In : Methods Enzymatic of Analysis
BERGMEYER H.U. Editeur. Verlag. Chemie Weinheim, Bergstr, 1963, 650
- 414 - SCHMIDT E., SCHMIDT F.W.
Enzym. Biol. Clin, 1963, 3, 73
- 415 - SCHMIDT E., SCHMIDT F.W., HERFARTH C., OPITZ K., VOGEL W.
Enzym. Biol. Clin, 1966, 7, 167
- 416 - SCHMIDT E., SCHMIDT F.W., HERFARTH C., OPITZ K., VOGEL W.
Enzym. Biol. Clin, 1966, 7, 53
- 417 - SCHMIDT E.,
In Praktische Enzymologie ,
SCHMIDT F.W. Editeur. Verlag Huber Hans, STUTTGART, 1967
- 418 - SCHMIDT E., SCHMIDT F.W.
Nature, 1967, 213
- 419 - SCHMIDT E., SCHMIDT F.W., MOHR J.
Clin. Chim. Acta, 1967, 15, 337
- 420 - SCHNEIDER A.J., WILLIS M.
Clin. Chem, 1958, 4, 392
- 421 - SCHREIBER G., ECKSTEIN M., MAASS G., HOLZER H.
Biochem. Z, 1964, 340, 21
- 422 - SCHRÖCKERT W.M., BÄSSLER K.H.
Clin. Chim. Acta, 1971, 33, 55
- 423 - SCHWARTZ D.
Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes,
Editions. Médicales Flammarion. Paris, 1963
- 424 - SCHWARTZ M.K., NISSELBAUM J.S., BODANSKY O.
Amer. J. Clin. Path, 1963, 40, 103
- 425 - SCHWARTZ M.J., MIRSKY S., SHAEFER L.E.
Lancet, 1965, 1, 959
- 426 - SCHWARTZ M.K., BODANSKY O.
In 33

- 427 - SCOTTO P., SCARDI V.
Life Sciences, 1968, 1, 1121
- 428 - SEARLE G.L., CAVALIERI R.R.
Ann. N.Y. Acad. Sc, 1968, 148, 734
- 429 - SEARLE G.L., GULLI R., CAVALIERI R.R.
Metabolism, 1969, 18, 148
- 430 - SERBAN M., SERBAN M.
Rev. Roum. Bioch, 1970, 1, 231
- 431 - SHAW R.F., PEARSON C.M., CHOW DHURY S.R.
Enzym. Biol. Clin, 1966, 6, 10
- 432 - SHI HAN CHEN., GIBLETT E.R.
Amer. J. Hum. Genet, 1971, 23, 419
- 433 - SHELIAPINIKOV S.V., BOCHAROV A.L., JEJELAVA D.E., IVANOV V.I., KARPETSKY M.Y.
Résumé des communications, FEBS. Madrid, 1969, 52
- 434 - SHRAGO E., LARDY H.A.
J. Biol. Chem, 1966, 241, 663
- 435 - SHRAWDER E., MARTINEZ-CARRION M.
J. Biol. Chem, 1972, 247, 2486
- 436 - SIMMONDS. P. G., PETTITT B.C., ZLATKIS A.
Anal. Chemistry, 1967, 39, 164
- 437 - SIMON E., VERES E., BANKI G.
Scand. J. Resp. Dis, 1969, 50, 314
- 438 - SMITH P.
J. Chrom, 1966, 30, 273
- 439 - SNELL E.E.
J. Amer. Chem. Soc, 1945, 67, 194
- 440 - SNOKE R.E., JOHNSTON J.B., LARDY H.A.
Europ. J. Biochem, 1971, 24, 342
- 441 - SODA K.
Agr. Biol. Chem, 1967, 31, 1054
- 442 - SOLING H.D.
In : Pharmacokinetics and mode of action of oral hypoglycaemic agents
LOUBATIERES A., RENOLD A.E. Editeurs, Casa Editrice "Il Ponte", MILANO, 1969, 6, 656
- 443 - SÖLING H.D., ZAHLTEN R., BOTTCHE M., WILLMS B.
Diabetologia, 1967, 3, 377
- 444 - SÖLING H.D., WILLMS B., KLEINEKE J., GEHLHOFF M.
Europ. J. Biochem, 1970, 16, 289
- 445 - SÖLING H.D., WILLMS B., KLEINEKE J.
In : Regulation of gluconeogenesis,
SÖLING D. WILLMS B. Editeurs, Academic Press, LONDON, 1971, 210
- 446 - SPACKMAN D.H., STEIN W.E., MOORE S.
Anal. Chem, 1958, 30, 1190
- 447 - SPIKNER J.E., TOWNE J.C.
Anal. Chem, 1962, 34, 1468
- 448 - STANKIEWICZ M.J., CHENG S., MARTINEZ-CARRION M.
Biochemistry, 1971, 10, 15
- 449 - STEIN E.R., CLARK D.A., FORTNEY S.R.
Toxicol. Appl. Pharmacol, 1971, 18, 274
- 450 - STEINBERG D., BALDWIN D., OSTROW B.H.
J. Lab. Clin. Med, 1956, 48, 144
- 451 - STEPAN J., VECEREK B.
FEBS Letters, 1969, 4, 151
- 452 - STERNE J.
In : Oral hypoglycaemic agents. Pharmacology and therapeutics,
CAMPBELL G.D. Editeur. Academic Press, LONDON, 1969
- 453 - STERNE J., LE GUILCHER S.
Le Diabète, 1972, 20, 43

- 454 - STONER G.A.
Anal. Biochem, 1967, 21, 313
- 455 - STONER E.R.
Metabolism, 1971, 20, 464
- 456 - STORK H., SCHMIDT F.H.
In : Regulation of gluconeogenesis,
SÖLING H.D., WILLMS B., Editeurs, Academic Press, LONDON 1971, 140
- 457 - STÖRMER B., JANSSEN W., REINAUER H.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem, 1970, 351, 296
- 458 - STOWERS J.M., BEWSHER P.D.
Postgrad. Med. J, 1969, 13
- 459 - SZELINBERG A., ZOREFF E., GOLAN R.
Life Science, 1969, 8, 943
- 460 - TEAFORD M.E., KAPLAN A.
Clin. Chim. Acta, 1967, 15, 133
- 461 - TIELT-HANSEN P., SIGGAARD-ANDERSEN O.
Scand. J. Clin. Lab. Invest, 1971, 27, 15
- 462 - THOMSON W.H.S.
Clin. Chim. Acta, 1968, 21, 469
- 463 - TOEWS C., KYNER J., CONNOR J.J., CAHILL G.F.
Diabetes, 1970, 21, 368
- 464 - TONHAZY N.E., WHITE N.G., UMBREIT W.W.
Arch. Biochem, 1950, 36, 28
- 465 - TORDETCARIDROIT C.
Ann. Biol. Anim. Bioch, 1971, 11, 389
- 466 - TOURY R.
Année Biol, 1971, 10, 37
- 467 - TRINDER P., KIRKLAND J.F.
Technicon Symposia - Automation in Analytical Chemistry, 1966 609
- 468 - TRINDER P., KIRKLAND J.F.
Clin. Chim. Acta, 1967, 16, 287
- 469 - UDENFRIEND S.
Fluorescence assay in biology and medicin,
Academic Press, Editeur, NEW-YORK, 1964
- 470 - UNGAR G.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med, 1957, 25, 190
- 471 - UTTER M.F.
J. Vitaminology, 1968, 14, 68
- 472 - VAN DEN BOSCHE H., VAN BELLE H.
Technicon Symposia - Automation in Analytical Chemistry, 1965
- 473 - VARGAS L., FRIEDERICI H.H.R., MAINENCO H.C.
Diabetes, 1970, 19, 33
- 474 - VELICK S.F., VAVRA J.
J. Biol. Chem, 1962, 237, 210
- 475 - VERGNES H.
Nouv. Rev. Franç. Hémat, 1966, 6, 301
- 476 - VERITY M.A., GALLAGHER R., BROWN W.J.
Biochem. J, 1967, 103, 375
- 477 - VERMEULEN A., ROTTIERS R.
Diabetologia, 1972, 8, 8
- 478 - VIGNAIS P.V.
In : Problèmes actuels de Biochimie Générale,
BOULANGER P. POLONOVSKI J. Masson. Editeur, 1972

- 479 - VIGNERON C.
Thèse, Faculté de Pharmacie, Nancy, 1970
- 480 - VOIGT K.D., APOSTOLAKIS M.
Klin. Wschr, 1969, 47, 157
- 481 - VON DABEW D.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem, 1970, 8, 12
- 482 - VON HAUG H., GATHOF A.G.
Blut, 1966, 13, 366
- 483 - VON LOBERT W., SCHILLINGER R.E., KRAAZ W., LOGE O., JAHN P.
Arzneim-Forsch, 1972, 22, 1157
- 484 - WADA H., MORINO Y.
Vitamins Hormones, 1964, 22, 411
- 485 - WAKIM K.G., FLEISCHER G.A.
J. Lab. Clin. Med, 1963, 61, 107
- 486 - WALDORF M.A., KIRK M.C., LINKSWILER H., HARPER A.E.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med, 1963, 112, 764
- 487 - WALTER P., ANABITARTE N.
FEBS Letters, 1971, 12, 289
- 488 - WAREMBOURG H., JAILLARD J.
Lille Médical, 1967, 12, 510
- 489 - WATTIAUX R., WATTIAUX-DE-CONINCK S., RONVEAUX-DUPAL M.F.
Europ. J. Biochem, 1971, 22, 31
- 490 - WEBB I.L.
In : Enzyme and metabolic inhibitors,
Academic Press, LONDON, 1966, 2
- 491 - WERNER M., TOLLS R.E., HULTIN J.V., MELLECKE R.J.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem, 1970, 8, 105
- 492 - WHICHELOW M.J., BUTTERFIELD W.J.H.
Postgrad. Med, J, 1969, may suppl, 24
- 493 - WICK A.N., STEWART C.J., SERIF G.S.
Diabetes, 1960, 2, 163
- 494 - WIELAND O., MENAHAN L.A., JAGOW-WESTERMANN B.V.
In : Metabolic regulation and enzyme action,
SOLS A. GRISOLIA S. Editeurs, Academic Press. LONDON, 1970, 19, 77
- 495 - WIELAND O., JAGOW-WESTERMANN B.
In 33
- 496 - WIEME R.J.
Clin. Chim. Acta, 1959, 4, 317
- 497 - WILKINSON J.H.
In : Isoenzymes,
CHAPMAN. HALL L.T.D. Editeurs. LONDON, 1970
- 498 - WILLIAMS G.Z., YOUNG D.S., STEIN M.R., COTLOVE E.
Clin. Chem, 1970, 16, 1016
- 499 - WILLIAMSON D.H., LOPES-VIEIRA O., WALKER B.
Biochem. J, 1967, 104, 497
- 500 - WILLIAMSON J.R., OLSON M.S.
Biochem. Biophys. Res. Commun, 1968, 32, 794
- 501 - WIMHURST J.M., MANCHESTER K.L.
Biochem. J, 1970, 120, 95
- 502 - WINKLER L.
Z. Anal. Chem, 1901, 40, 523
- 503 - WINSTEN S.
In : Standard Methods of Clinical Chemistry, 1965, 5, 1
- 504 - WINSTEN S., WILKINSON J.H., BOUTWELL J.H.
Clin. Chem, 1969, 15, 496

- 505 - WOLFF J.P.
Mises au point de Chimie Analytique, 12e série .
Masson et Cie. Editeurs, Paris, 1964
- 506 - WOOD H.G.
J. Vitaminology, 1968, 14, 59
- 507 - WOOD T.
J. Chrom, 1968, 34, 122
- 508 - YEUNG D., OLIVER T.
Biochem. J, 1967, 103, 744
- 509 - YOSHIKAWA K.
Tohoku. J. Exp. Med, 1968, 96, 127
- 510 - YOUNG D.S., HARRIS E.K., COTLOVE E.
Clin. Chem, 1971, 17, 403
- 511 - YOUNG D.A.B., RENOLD A.E.
Clin. Chim. Acta, 1966, 13, 791
- 512 - ZIMMERMAN H.J., DUJOVNE C.A., LEVY R.
Comp. Biochem. Physiol, 1968, 25, 1081

TABLE DES MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>	
<u>PREMIERE PARTIE : METHODES UTILISEES ET MISES AU POINT</u>	
<u>CHAPITRE 1</u> - SEPARATION ET MESURE DES 2 OXO ACIDES.....	11
1.1. Propriétés générales des 2 oxo acides.....	12
1.2. Séparation chromatographique.....	16
1.3. Dosages	34
<u>CHAPITRE 2</u> - SEPARATION ET DOSAGE DES AMINO ACIDES.....	31
<u>CHAPITRE 3</u> - ENZYMES, IONS ET AUTRES METABOLITES.....	45
3.1. Mesure des activités enzymatiques.....	45
3.2. Dosage du lactate	47
3.3. Dosage du glucose	51
3.4. Dosage des protéines	52
3.5. Cations	53
<u>CHAPITRE 4</u> - TECHNIQUES PARTICULIERES	55
4.1. Ultracentrifugation	55
4.2. Mesure polarographique de l'oxygène	55
4.3. Microscopie électronique	60
<u>CHAPITRE 5</u> - MATERIEL BIOLOGIQUE ET TESTS STATISTIQUES UTILISES	65
5.1. Matériel biologique humain	65
5.2. Matériel biologique animal	65
5.3. Tests statistiques utilisés	67
<u>DEUXIEME PARTIE : ETUDE DES ISOENZYMES DE LA L-ASPARTATE AMINOTRANSFERASE</u>	
<u>CHAPITRE 6</u> - DONNEES ACTUELLES SUR LES ASPARTATE AMINOTRANSFERASES	71
6.1. Localisation	73
6.2. Propriétés	74
6.3. Structure et mécanisme d'action	79

<u>CHAPITRE 7</u> - METHODES DE MESURE DE L'ACTIVITE DE LA L ASPARTATE AMINO TRANSFERASE	8
7.1. Méthodes existantes	83
7.2. Etude technique comparative	89
7.3. Dosage dans le plasma humain	96
7.4. Dosage dans les érythrocytes	101
7.5. Dans les tissus	105
 <u>CHAPITRE 8</u> - EXTRACTION ET SEPARATION DES ISOENZYMES	111
8.1. Homogénéisation du tissu	111
8.2. Fractionnement de l'homogénat	116
8.3. Séparation des isoenzymes	129
 <u>CHAPITRE 9</u> - VARIATIONS DE LA L ASPARTATE : 2 OXOGLUTARATE AMINOTRANSFERASE GLOBULAIRE, TISSULAIRE ET PLASMATIQUE	14
9.1. Variations de la L.aspartate : 2 oxoglutarate amino transférase dans les érythrocytes.....	14
9.2. Variations de la L.aspartate : 2 oxoglutarate amino transférase tissulaire et plasmatique	14
9.3. Valeurs obtenues chez des sujets diabétiques	16
 <u>TROISIEME PARTIE : APPLICATION AU MECANISME D'ACTION DES BIGUANIDES HYPO-GLYCEMIANTS</u>	
<u>CHAPITRE 10</u> - UTILISATION THERAPEUTIQUE DES BIGUANIDES. HYPOTHESES SUR LES MECANISMES D'ACTION	16
10.1. Métabolisme des biguanides	16
10.2. Propriétés pharmacologiques.....	16
10.3. Mécanisme d'action	17
 <u>CHAPITRE 11</u> - ETUDE DE L'EFFET DES BIGUANIDES CHEZ L'HOMME	18
11.1. 2 oxo acides urinaires	18
11.2. Paramètres chimiques Activités enzymatiques plasmatiques	18
 <u>CHAPITRE 12</u> - JEUNE ET GLUCONEOGENESE	18
12.1. Connaissances actuelles sur la gluconéogénèse.....	18
12.2. Résultats et discussion	19

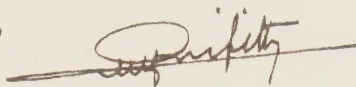
<u>CHAPITRE 13</u> - ETUDE IN VIVO CHEZ LE RAT.....	205
13.1. Glycémie	207
13.2. Protéines	208
13.3. Activités enzymatiques de la GOT et de la MDH.....	210
13.4. Acides aminés	215
13.5. Acide lactique	218
13.6. Cations	223
13.7. Etude morphologique des mitochondries	227
13.8. Conclusion	230
 <u>CHAPITRE 14</u> - ETUDE DE L'EFFET DES BIGUANIDES IN VITRO	233
14.1. Etude de l'influence des biguanides sur l'activité des isoenzymes de la GOT	233
14.2. Etude de l'influence des biguanides sur la perméa- bilité des mitochondries	235
14.3. Etude de l'effet des biguanides sur la respiration des mitochondries	243
14.4. Conclusion	249
 <u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	251
 <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	257



VU,

NANCY, le 9 Janvier 1973

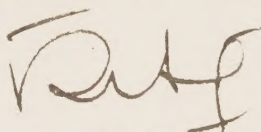
Le Président de Thèse,



VU et APPROUVE,

NANCY, le 19 Janvier 1973

Le Directeur de l'U.E.R. des Sciences
Pharmaceutiques et Biologiques de
l'Université de NANCY I,



R. BENE

VU,

NANCY, le 23 Janvier 1973

Le Président de l'Université de NANCY I,

